OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Streptococcus oralisのglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseはPorphyromonas gingivalis線毛に対する共凝集素として機能する
Author(s)	前田, 和彦
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/880
DOI	
Rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

http://ir.library.osaka-u.ac.jp/dspace/

Osaka University

Streptococcus oralis の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase は *Porphyromonas gingivalis* 線毛に対する共凝集素として機能する

大阪大学大学院歯学研究科　分子病態口腔科学専攻
口腔分子免疫制御学講座　　予防歯科学教室
前田　和彦

緒　　言

有力な歯周病原性菌である *Porphyromonas gingivalis* はタンパク質分解酵素, 赤血球凝集素やリポ多糖など種々の歯周病に関わる病原因子を有している [34, 48, 52]。本菌がその病原性を発揮するためには, まず, 歯周ポケット内に定着することが必要であり, その過程において, 歯面, 歯肉溝上皮あるいは初期プラーク形成菌などへの付着が重要な役割を果たすと考えられている [46,49]。

これまでに, *P. gingivalis* の菌体表層付着成分としては, 線毛, 小胞や赤血球凝集素などが知られている。 *P. gingivalis* の線毛は, 上皮細胞 [19], ヒト線維芽細胞 [26]および唾液で被覆されたハイドロキシアパタイトビーズ [2, 39]と相互作用し, *P. gingivalis* の小胞はコラーゲンで被覆されたハイドロキシアパタイトビーズと相互作用することが報告されている [39]。さらに, *P. gingivalis* は *Actinomyces naeslundii*[47, 54], *Actinomyces viscosus*[12, 15, 32, 33, 47], *Streptococcus gordonii*[29], *Streptococcus mutans*[21], *Streptococcus oralis*[36]および *Streptococcus sanguis*[50]など種々の口腔常在グラム陽性菌と付着 (共凝集)することが示されている [25]。 そして, *P. gingivalis* の口腔常在グラム陽性菌との共凝集に関与する菌体表層成分については,線毛が *A. viscosus*[15]や *S. gordonii*[30]との共凝集に関与すること,小胞が *A. naeslundii*[11]や *A. viscosus*[17], *S. mutans*[21]との結合能を有することや赤血球凝集素が *A. viscosus* を凝集させることなどが明らかにされている [43]。

一方, 口腔常在グラム陽性菌の *P. gingivalis* との共凝集に関与する菌体表層成分に関しては, *S. gordonii* の antigen I/II family に属する外膜アドヘジン (SspA および SspB)[20]や *A. naeslundii* の 200kDa 以上の分子量をもつ糖タンパク質 (AnAF)[54]が *P. gingivalis* との共凝集に関与することが報告されているのみで, *P. gingivalis* との共凝集に広く関与する口腔常在グラム陽性菌の菌体表層成分やその作用機序については不明な点が多い。

著者の研究室では，これまでに，種々の口腔常在グラム陽性菌を用いて *P. gingivalis* 381 株との共凝集反応を調べ, *S. oralis* ATCC 9811 株が強い共凝集を示すことを明らかにした。さらに，この菌を用いて *P. gingivalis* 381 株との共凝集に関する一連の研究を行った結果, *P. gingivalis* 381 株と *S. oralis* ATCC 9811 株との共凝集は，ヒト唾液や血清，特にヒトフィブリノーゲンにより強く阻害されること [36, 37]や，L-アルギニンや L-リジンにより阻害されることを報告した [37]。 また，共凝集に関与する *P. gingivalis* の菌体表層成分を調べた結果，*P. gingivalis* 381 株の線毛が *S. oralis* ATCC 9811 株をはじめとする種々の口腔常在グラム陽性菌と結合し，その結合領域は線毛の C 末端側に存在することを示した [3]。 しかし, *S. oralis* ATCC 9811 株の菌体表層に存在する共凝集素についての詳細は未だ不明である。

本研究では，*S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素を同定･精製し，その結合特性を調べるとともに，遺伝子をクローニングした。さらに，この共凝集素が種々の口腔レンサ球菌の菌体表層に広く存在することを示し，*P. gingivalis* の歯周ポケットへの定着機序の一端を明らかにすることを目的とした。

実験材料ならびに方法

1. 供試菌株および培養条件

P. gingivalis 381 株は，サンスター株式会社研究開発部より分与された。 嫌気性菌用羊血液寒天培地 (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社,東京)に接種し，嫌気培養装置 (Forma Scientific Anaerobic System Model 1024; Marietta, OH, U.S.A.)を用い嫌気的条件下 (10% CO_2, 10% H_2, 80% N_2)にて 35℃で培養を行い, 2 週間ごとに新たな培地に継代した。供試菌の培養は，保存培地より 1 mg/ml の酵母エキス (BBL; Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, U.S.A.), 5 μg/ml のヘミン (Sigma; Sigma-Aldrich Japan K.K., 東京)および 1 μg/ml のメナジオン (Sigma)を含む 30 g/l のトリプチケースソイブロス (BBL) 10 ml に接種し，嫌気的条件下にて 35℃で 24 時間静置培養した。 *S. oralis* ATCC 9811 株は American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.)より得た。凍結保存した菌をブレインハートインフュージョンブロス (BHI: brain heart infusion broth; BBL) 10 ml に接種し，大気中で 35℃, 15 時間静置培養した。この培養液を同培養液 100 ml に移し，同一条件で培養後，さらに同培養液 3,000 ml に移し静置培養した。

S. oralis ATCC 10557 株, *S. sanguinis* ATCC 10556 株および *Streptococcus parasanguinis*

ATCC 15909 株は American Type Culture Collection より得た。*S. gordonii* G9B 株はニューヨーク州立大学バッファロー校の Genco 博士より恵与された。*S. mutans* MT 8148 株は，大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座口腔細菌学教室より恵与された。*Streptococcus milleri* 10703 株は National Collection of Type Cultures (London, England)より得た。*Streptococcus sobrinus* K1-9 株, B-13 株, 6715 株, *Streptococcus salivarius* OMZ 65 株, HHT 株, *Streptococcus cricetus* HS-1 株，および HS-6 株は，本予防歯科学教室での保存株を用い，これらのグラム陽性菌は *S. oralis* ATCC 9811 株と同様の条件で培養した。

培養菌は 5,000×g, 30 分の遠心操作により集菌し, 0.15 M 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (PBS: phosphate-buffered saline, pH 6.0)で 3 度洗浄後，同緩衝液に懸濁した。 *Escherichia coli* JM109 株 (タカラバイオ，滋賀), BL21(DE3) 株 (Novagen, Madison, WI, U.S.A.)は, Luria-Bertani (LB)液体培地 [トリプトン (1 mg/ml), 酵母エキス (1 mg/ml), 塩化ナトリウム (0.5 mg/ml)]または LB 寒天培地で培養し，必要に応じてアンピシリンナトリウム (50 μg/ml; 和光純薬工業，大阪)を加えたものを選択培地として用いた。

2. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

電気泳動は Laemmli の方法[28]に従い, 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)を含む 12.5% ポリアクリルアミドゲルを支持体として行った。試料は 2% SDS, 6% β-メルカプトエタノールを含む 62.5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)に溶解し，室温で 30 分間前処理した。 泳動用緩衝液には，トリス/グリシン/SDS 緩衝液 (Bio-Rad; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.)を用い，室温, 25 mA の条件下で 1.5 時間電気泳動を行った。 泳動後，クマシーブリリアントブルー (CBB: Coomassie Brilliant Blue)によりタンパク質を染色した。

分子量測定のための標準タンパク質標品として，SDS 電気泳動用 LMW Calibration キット (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J., U.S.A.; ホスホリラーゼ B; 97 kDa, アルブミン; 66 kDa, 卵白アルブミン; 45 kDa, 炭酸脱水酵素; 30 kDa, トリプシンインヒビター; 20.1 kDa, α-ラクトアルブミン; 14.4 kDa)を用いた。

タンパク質濃度は BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, Ill., U.S.A.)を使用し，ウシ血清アルブミン (BSA: bovine serum albumin)を基準として測定した。

3. *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素の同定

Nagata らによる方法[38]で精製した *P. gingivalis* のリコンビナント線毛 (rFimA)に結合する

S. oralis 菌体表層成分を Lamont らの方法[31]により同定した。すなわち, *S. oralis* ATCC 9811 株菌体を塩化カリウム緩衝液 [5 mM 塩化カリウム, 2 mM リン酸一水素カリウム, 1 mM 塩化カルシウム (pH 6.0)]で洗浄後, 0.1 M 炭酸ナトリウム (pH 8.1)に懸濁した。 *N*-ヒドロキシサクシンイミドビオチン (3 mg/10^{10}個; Sigma)と室温で3時間反応させた後, 10,000×g, 10 分の遠心操作により集菌し, 2 度洗浄後, 同緩衝液に懸濁した。 菌体懸濁液は超音波破砕装置 UR-200P (トミー精工, 東京)を用いて, 氷上にて 200W, 1 分間の超音波処理を行った。超音波処理後の標品を 5,000×g, 30 分の遠心操作により分画し, *S. oralis* のビオチンラベルした上清画分 (150 μg)を *P. gingivalis* rFimA (50 μg)と室温で 2 時間反応させた。 さらに, ウサギ抗 rFimA ポリクローナル抗体 IgG (1:500; 北海道システムサイエンス, 札幌)と室温で 30 分間反応させた後, 懸濁液を Affi-Gel プロテイン A アガロースビーズ (10 μg; Bio-Rad)と 4℃で 1 時間振盪した。 Affi-Gel プロテイン A MAPS II 結合液 (Bio-Rad)で 4 度洗浄した後, 結合した成分を Affi-Gel プロテイン A MAPS II 溶出液 (Bio-Rad)にて溶出した。 溶出した成分を SDS-PAGE で展開後, トランスブロット SD セル (Bio-Rad)を用いてニトロセルロース膜 (ポアサイズ 0.2 μm ; Bio-Rad)に 15 V で 45 分間転写した。 転写後の膜は, ブロックエース (雪印乳業, 札幌)により室温で 1 時間ブロッキング後, 10 mM PBS (pH 6.0)で 2,000 倍に希釈したアビジン- 西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) Conjugate (Bio-Rad)と室温で 1 時間振盪した。 0.05% ポリオキシエチレン (20)ソルビタンモノラウレート (Tween20; 和光純薬工業)を含む PBS 緩衝液で 15 分, 3 度洗浄後, HRP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad)を用いて, *P. gingivalis* rFimA と結合した *S. oralis* ATCC 9811 株菌体表層成分を検出した。

4. *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素の精製

S. oralis ATCC 9811 株菌体表層成分は, 上記と同様に, 菌体懸濁液を氷上にて 200W, 1 分間の超音波処理を行うことにより調製した。 超音波処理後, 5,000×g, 30 分の遠心操作により得られた上清画分を, さらに 25,000×g, 30 分の遠心操作し, 得られた沈渣を 1% 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸 (CHAPS; 和光純薬工業)を含む 10 mM PBS 緩衝液に溶解した。 溶解後, 25,000×g, 30 分の遠心操作により得られた上清画分に硫酸アンモニウムを 30%飽和となるように加え, 4℃で 3 時間反応させた後, 25,000×g, 30 分の遠心操作により沈渣を回収した。 2 M 尿素含有 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)にて沈査を透析した後, 同緩衝液で平衡化した *P. gingivalis* rFimA 架橋 CNBr-activated Sepharose 4B アフィニティカラム (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)に展

開した。 rFimA 架橋は Amersham Pharmacia Biotech 社の取扱説明書のとおりに行った。 十分量の同緩衝液にて非吸着画分を洗浄後，0.5 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液にて rFimA 吸着画分を溶出させた。得られた rFimA 結合画分を，*S. oralis* ATCC 9811 株の精製共凝集素とし，その純度と分子量を SDS-PAGE により確認した。

5. ウエスタンブロット法

精製標品 (5 μg)を SDS-PAGE で展開し，ニトロセルロース膜に転写した。 膜をブロックエースで室温, 1 時間ブロッキング後, PBS に懸濁した rFimA (1 mg/ml)と 4℃で一晩振盪した。0.05% Tween 20 を含む PBS で 3 度洗浄後，同緩衝液で 400 倍に希釈したウサギ抗 rFimA ポリクローナル抗体[38]と 4℃で一晩振盪し，洗浄後，同緩衝液で 2,000 倍に希釈した HRP－ヤギ抗ウサギ IgG (H+L; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, U.S.A.)と室温で 1 時間振盪した。 洗浄後, HRP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad)を用いて結合した rFimA を検出した。

分子量測定のための標準タンパク質標品として，Prestrained SDS-PAGE Standards Low Range (Bio-Rad; ホスホリラーゼ B; 112 kDa, BSA; 81 kDa, 卵白アルブミン; 49.9 kDa, 炭酸脱水酵素; 36.2 kDa, 大豆トリプシンインヒビター; 29.9 kDa, リゾチーム; 21.3 kDa)を用いた。

6. 共凝集活性の測定

共凝集活性の測定は，Nagata らの方法[36]および Cisar らの方法[8]により行った。 前者は 10 mM PBS (pH 6.0) 2 ml の反応液中に 5×10^8 個の *P. gingivalis* 381 株菌体と 5×10^8 個の *S. oralis* ATCC 9811 株菌体を加え，分光光度計 (UV-265FW; 島津製作所，京都)を用いて 37℃で攪拌しながら，波長 550nm の吸光度 (A_{550})の変化を 7.5 分間測定した。 計測後, 1 分間あたりの最大の吸光度変化量を読み取り，*P. gingivalis* 381 株の自己凝集を差し引いた値を共凝集活性とした。 共凝集阻害率は下記の計算式に基づき算出した。

阻害率 (%)＝｛(A-B) ÷ A｝×100

(A: 阻害物質を添加しない時の共凝集活性, B: 阻害物質を添加した時の共凝集活性)

後者は, 5×10^8 個の *P. gingivalis* 381 株と 5×10^8 個の口腔レンサ球菌を 1 mM トリス塩酸, 0.1 mM 塩化カルシウム, 0.15 M 塩化ナトリウム, 0.1 mM 塩化マグネシウムおよび 0.02% アジ化ナトリウム (pH 7.2)を含む緩衝液に懸濁し，室温で 10 分間振盪した。共凝集活性は肉眼にて 0 (凝集なし), 1 (均一な弱い凝集), 2 (懸濁液は濁ったままであるが，容易に観察でき

る明確な凝集), 3 (上清にいくつかの濁りが残っているが，非常に強い凝集), 4 (上清が澄みかつ非常に強い凝集)までの 5 段階で判定した。

7. *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素のアミノ酸配列解析

精製した共凝集素を SDS-PAGE で展開し，ポリビニリデンフロライド (PVDF)膜 (Trans-blot Transfer Medium 0.2 μm, Bio-Rad)に転写した。 転写後, CBB 染色により染色されたバンドを切り出し, N 末端アミノ酸配列を決定した。 さらに内部アミノ酸配列を得るために, 精製標品を SDS-PAGE で展開し，CBB 染色により染色されたバンドをゲルから切り出した。 ゲル断片を 40% メタノールで 10 分間, 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.5)-メタノール (1:1)で 10 分間，さらに 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0)で 10 分間洗浄し, Speed-Vac (Savant Instruments, Holbrook, N.Y., U.S.A.)により減圧下で乾燥した。 約 1 μg のタンパク質を含有した乾燥ゲルを 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0)- 0.05% ポリオキシエチレン (10)オクチルフェニルエーテル (Triton X-100; 和光純薬工業)に溶解したリシルエンドペプチダーゼ (250 ng)と 37℃で 16 時間反応させた。 酵素処理後, 1% トリフルオロ酢酸 (TFA)を添加した 60%アセトニトリルを加え，その上清を逆相高速液体クロマトグラフィ (日立, 東京)に展開した。 0.1% TFA を含有する蒸留水で平衡化した C_{18} カラム (Vydac 218TP5215; 2.1×150 mm)を使用し, 1 ml/min の流速で, 0.1% TFA を含有する 60% アセトニトリルによる 0 から 60%の濃度勾配で展開し，フラクションを手動で分取した。 N 末端アミノ酸配列や内部アミノ酸配列は Procise-cLC シーケンサー (PE Biosystems, Branchburg, N.J., U.S.A.)を用いて解析した。

8. GAPDH 遺伝子のクローニング

S. oralis ATCC 9811 株の共凝集素の N 末端および内部アミノ酸配列を DDBJ (http://srs.ddbj.nig.ac.jp) の FASTA を用いて検索した結果，*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pneumoniae*, および *S. gordonii* ですでに報告されている glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)と非常に高い相同性を示した。 したがって，上記の 4 菌種の GAPDH において完全に一致する塩基配列から設計したプライマー Sof1 (5’-AGTTCTGTTGAAAGG-3’) と Sor1 (5’-CGAAAAAGAACTCAGC-3’) (SIGMA Genosys Japan，石狩)を用いて, *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素の遺伝子クローニングを行った。 *S. oralis* の共凝集素をコードする遺伝子断片は，ポリメラーゼチェーンリアクション法 (PCR)により Gene Amp 2400 装置 (PE Biosystems)を用いて増幅した。PCR 増幅は,

S. oralis ATCC 9811 株より Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, Minn., U.S.A.)を用いて調製したゲノム DNA (10 ng), 50 mM 塩化カリウム, 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.3), 2.5 mM 塩化マグネシウム, 200 μM デオキシヌクレオチド-3-リン酸, 1.0 μM プライマー (Sof1 と Sor1),および 0.025 U AmpliTaq Gold DNA ポリメラーゼを, 最終量 100 μl となるように加え, 94℃で 9 分間反応後, 94℃で 45 秒, 50℃で 1 分および 72℃で 8 分の反応を 33 サイクル行った。 アガロース電気泳動後, 得られた PCR 産物 (1,143 bp)をゲルから精製し, 大腸菌クローニングベクターpCR2.1-TOPO (TA Cloning Kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)にライゲーションし, 共凝集素の遺伝子を含むプラスミドを構築した。化学処理法により構築プラスミドを導入した *E. coli* TOPO10 株を, アンピシリンと X-gal (Invitrogen)添加 LB 寒天培地にて, 白色コロニーにより選択した。 インサートの確認はプライマー (Sof1 と Sor1)を用いたダイレクト PCR と, 制限酵素 *Eco*RI (New England Biolabs, Beverly, Mass., U.S.A)による酵素処理後のアガロース電気泳動により確認した。 *S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH の DNA 配列はベクター特有のプライマーの M13 (-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3')と M13 リバース (5'-CAGGAAACA GCTATGAC-3'), Sof2 (5'-GTAGTTAAAGTTGGTATT-3'), Sof3 (5'-CGTTTCGACGGTACT-3'), Sor2 (5'-ACCGTC AACGTCAAGAA-3')および Sor3 (5'-GCAGCACCAGTTGA-3')の 4 つのプライマー (SIGMA Genosys Japan)を用いて決定した。 塩基配列の決定には DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences)を用い, 0.2 pmol プラスミド, 5 pmol のプライマー, 8 μl シークエンシング反応液を, 全量 20 μl となるように混合し, 95℃で 1 分間反応後, 95℃で 20 秒, 50℃で 15 秒および 60℃で 60 秒の反応を 25 サイクル行った。 増幅反応液から未反応ヌクレオチドや塩を SigmaSpin Postreaction Purification カラム (Sigma)を用いて除去した後, ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems)により, 共凝集素の塩基配列を決定した。

9. サザンハイブリダイゼーション

サザンブロット解析はジゴキシゲニン (DIG) High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて行った。すなわち, Sof2 と Sor2 のプライマー (25 ng/ml)を用いて増幅された PCR 産物を電気泳動した後, 909 bp の DNA 断片を精製し, DIG でラベルしたプローブを作製した。

S. oralis ATCC 9811 株のゲノム DNA (4 μg)は GAPDH 遺伝子配列内で切断部位のない酵素 10 種類 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*I および *Xba*I (New England Biolabs)により, 37℃で一晩, 酵素処理を行った。酵素処理産物のアガロース電気泳動後, 20

×SSC (1×SSC は 0.015 M クエン酸ナトリウムを含んだ 0.15 M 塩化ナトリウム)をトランスファーバッファーとしてポジティブチャージのナイロンメンブレン (Roche Diagnostics) に DNA を一晩ブロッティングし, UV 照射にて固定した。 メンブレンを 10 ml の DIG Easy Hyb バッファーで, 42℃で 30 分間プレハイブリダイゼーションし, DIG ラベルされたプローブ (87.5 ng)を含む 3.5 ml の DIG Easy Hyb バッファーで 42℃で一晩, ハイブリダイゼーションした。 ハイブリダイゼーション後, メンブレンは洗浄液 A (0.1% SDS を含有する 2×SSC)により室温で 2 度, 洗浄液 B (0.1% SDS を含有する 0.5×SSC)により 68℃で 2 度洗浄し, 洗浄液 C (150 mM 塩化ナトリウムと 0.3% Tween20 を含有する 100 mM マレイン酸)で 5 分間平衡化した後, 1%ブロッキング液 (150 mM 塩化ナトリウムを含有する 100 mM マレイン酸)で 1 時間ブロッキングした。 抗 DIG アルカリフォスファターゼ (150 mU/ml)を添加した新鮮なブロッキング液にメンブレンを 30 分間振盪し, 洗浄液 C で 15 分間洗浄した。検出液 (0.1 M 塩化ナトリウム[pH 9.5]を含有する 0.1 M トリス)で平衡化した後, CDP-Star 反応液 (disodium 2-chloro-5-{4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricycle(3,3,1,1) decan]-4-yl}-1-phenyl phosphate)を用いてバンドを検出した。

10. *S. oralis* ATCC 9811 株からの pH 調整分泌型 GAPDH の精製

Nelson ら [41]は, pH を調整することにより *S. gordonii* から分泌型 GAPDH を精製する方法を報告している。 この方法を用いて, *S. oralis* ATCC 9811 株から GAPDH を精製した。 すなわち, 凍結保存した *S. oralis* ATCC 9811 株を 1l につきトリプチケースペプトン (2 g), 酵母エキス (5 g), 塩化ナトリウム (2 g), 塩化カルシウム (0.1 g), リン酸一水素カリウム (4 g), リン酸二水素カリウム (1 g), グルコース (10 g), L-アルギニン (0.5 g)を含む培地に培養し, 2 N 水酸化カリウムを添加することにより pH 7.5 に調整した。培養液を 6,000×g, 20 分で遠心操作して得られた培養上清を 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.3)で透析し, 30 kDa MW cut-off メンブレン (Amicon, Millipore Corp., Bedford, Mass., U.S.A.)で濃縮した。 濃縮液を同緩衝液にて平衡化した Cibacron Blue Sepharose カラム (3.0×15 cm; Amersham Pharmacia Biotech)に展開し, 十分量の同緩衝液にて非吸着画分を洗浄後, 結合した GAPDH を NAD^+ (和光純薬工業)を含有した同緩衝液にて溶出した。

11. リコンビナント *S. oralis* GAPDH の精製

リコンビナントGAPDH (rGAPDH)の作製はKuboniwaらの方法 [27]に準じて行った。 制限酵素 *Nco*I 認識配列 (下線部)を付加したセンスプライマー (5'-GCCCATGG

TAGTTAAAGTTGGTATTAACGGT-3')と，制限酵素 *Bam*HI認識配列 (下線部)を付加したアンチセンスプライマー (5'-GCGGATCCTTATTTAGCGATTTTTGCGAAGT-3') を用いて，*S. oralis* GAPDH 遺伝子をPCR法にて増幅した。 *S. oralis* GAPDH のPCR産物と大腸菌発現ベクターpET3d (Novagen Inc., Madison, Wis., U.S.A.)を，*Nco*Iと*Bam*HIにて処理後，電気泳動し，ゲルより精製した。 両断片のライゲーションにより*S. oralis* GAPDH 遺伝子を組み込んだプラスミドを構築した。 構築プラスミドを導入した*E. coli* BL21 (DE3)株をアンピシリン添加LB培地で培養し, 1 mM イソプロピルβ-D (-)-チオガラクトピラノシド (IPTG ; 和光純薬工業)を添加することによりrGAPDHの発現を誘導した。 2,500×g, 15 分の遠心操作により得られた菌体を 50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)にて洗浄後，同緩衝液に懸濁し，超音波破砕した。10,000×g, 30 分の遠心操作により沈渣を回収し, 1 Mスクロース溶液にて攪拌後，再度の遠心操作にて沈渣を回収し，2% Triton X-100 および 10 mM EDTAを含む 50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)に 12 時間撹拌した。 10,000×g, 30 分の遠心操作により得られた沈渣を, 8 M尿素および 0.1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF; 和光純薬工業)を含む 50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)にて可溶化した。 13,500×g, 30 分の遠心操作により得られた上清画分を, 8 M尿素を含む 50 mMトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)にて平衡化したSepharose CL-6Bゲル濾過カラム (2.5×150 cm; Pharmacia)に展開し，rGAPDHを精製した。

12. *S. oralis* GAPDH と *P. gingivalis* 線毛との結合特性の評価

P. gingivalis の rFimA と *S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH との結合特性の評価は生体分子間相互作用解析装置 BIAcore2000 (BIAcore, Uppsala, Sweden)により行った。 CM5 センサーチップ (BIAcore)上のカルボキシルメチルデキストラン層を *N*-ヒドロキシコハク酸イミドと塩酸 *N*-エチル-*N*-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドとの同量混合液により，流速 5 μl/min, 37℃で活性化し, 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8)に溶解した *S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH または rGAPDH (20 μg/ml)をリガンドとしてセンサーチップに固着した。 固着量は 650× (固着タンパクの分子量[40kDa]/線毛分子量[41kDa])レゾナンスユニット (RU)に設定し，未結合の活性部位は 1 M エタノールアミン-塩酸でブロッキングし，10 mM 水酸化ナトリウムで洗浄した。 アナライトとして 10 mM PBS (pH 6.0)で可溶化した *P. gingivalis* rFimA を固着した GAPDH チップとコントロールの未固着チップとに同時に流速 20 μl/min, 37℃で反応させ，コントロールの値を差し引いた値のセンサーグラムを解析した。 反応解析は，解析用ソフトウェア BIAevaluation version 3.1 (BIAcore)を用い，線

形解析法により行った。

13. 菌体表層 GAPDH 酵素活性の測定

口腔レンサ球菌表層の GAPDH 活性は Pancholi らの方法[44]により測定した。 すなわち, 口腔レンサ球菌 14 菌株の各菌懸濁液をグリセルアルデヒド-3-リン酸 (G-3-P, 49 mg/ml; Sigma)と 40 mM のトリエタノールアミン, 50 mM リン酸一水素ナトリウム, 5 mM EDTA (pH 8.6)および NAD^+と混合し, 室温で 2 分間反応後, 遠心操作により上清を回収した。 分光光度計 (UV-1600; 島津製作所)を用いて, 上清中の 340 nm の吸光度を測定することにより NAD^+から NADH への変化量を解析した。G-3-P を含まない反応液をコントロールとし, 特異的な GAPDH 酵素活性 (mM NADH/min)はコントロール値を差し引いて求めた。

14. 種々の口腔レンサ球菌の菌体表層 GAPDH の精製

強い菌体表層 GAPDH 活性および共凝集活性を示した *S. oralis* ATCC 9811 株, *S. oralis* ATCC 10557 株, *S. gordonii* G9B 株, *S. sanguinis* ATCC 10556 株および *S. parasanguinis* ATCC 15909 株の 5 菌株の菌体表層 GAPDH を Winram らの方法[53]により精製した。すなわち, 菌体を 30% ラフィノース, 1 mM PMSF および 1 mM *N*-トシル-L-リジンクロロメチルケトン塩酸塩 (TLCK; Sigma)を含む PBS に溶解し, 180 U/g 湿重量のムタノリジンを添加し, 37℃で 2 時間振盪した。 25,000×g, 30 分の遠心操作により得られた上清を 30 kDa MW cut-off メンブレン (Amicon)を用いて濃縮し, 前述と同様の方法で Cibacron Blue Sepharose CL-6B アフィニティカラムクロマトグラフィーにより, 各菌株の GAPDH を精製した。

15. 統計解析

GAPDH 活性と共凝集活性との相関はスピアマンの順位相関係数を用いて統計解析した。統計解析ソフトウエアは SPSS ver.10 を用いた。

16. DNA 配列アクセッション番号

本研究にて, *S. oralis* ATCC 9811株, *S. oralis* ATCC 10557株, *S. gordonii* G9B株, *S. sanguinis* ATCC 10556株および*S. parasanguinis* ATCC 15909株のGAPDH遺伝子配列をDDBJデータベースにそれぞれAB110908, AB163424, AB163425, AB163426および AB163427のアクセッション番号で登録した。 *S. pneumoniae* TIGR4株[51], *S. gordonii* FSS2株[41], *S. pyogenes* M1株, *S. equisimilis* H46A株[14], *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228株, *Staphylococcus aureus* N315

株および*Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586株[22)]のアクセッション番号はそれぞれAE007490, AF247678, AE006494, X97788, AE016745, AP003360およびAE010576であった。

結　果

1. *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素の同定

免疫沈降法により, *P. gingivalis* rFimA と結合するビオチンラベルした *S. oralis* ATCC 9811 株の菌体表層成分を検出した。 *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素は 40kDa の分子量をもつと推定された (図 1,レーン 4)。

2. *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素の精製

S. oralis ATCC 9811 株の共凝集素を超音波処理, CHAPS 処理, 硫安塩析処理, rFimA を架橋結合させた CNBr-activated Sepharose 4B アフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製した。 精製タンパク質は SDS-PAGE にて約 40kDa の位置に単一のバンドとして認められた (図 2A,レーン 2)。

3. *P. gingivalis* 線毛と *S. oralis* 共凝集素との結合

P. gingivalis rFimA と精製した *S. oralis* の共凝集素との結合をウエスタンブロット法により調べた。 その結果, 精製した *S. oralis* 共凝集素は *P. gingivalis* rFimA と結合することが示された (図 2B, レーン 2)。 また, 精製した共凝集素は *P. gingivalis* 381 株と *S. oralis* ATCC 9811 株との共凝集を濃度依存的に阻害し, 2.5 μg/ml の濃度で共凝集を完全に阻害した (図 3)。

4. *S. oralis* の共凝集素遺伝子のクローニング

S. oralis の 40kDa の分子量をもつ共凝集素の N 末端アミノ酸配列を決定したところ VVKVGINGFGRIGXLA であった。リシルエンドペプチダーゼで酵素処理し得られた断片の N 末端アミノ酸配列は ALQXNFXVXEGLMTTIXAYT と VLDVDGK であった。 これらのアミノ酸配列の相同性を DDBJ にて検索した結果, *S. gordonii*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* および *S. equisimilis* の GAPDH と非常に高い相同性を認めた。 これらのレンサ球菌の GAPDH の塩基配列の中で完全に一致している配列を基に, PCR プライマーSof1 と Sor1 を

設計した。 PCR 法により推定どおり 1.1kbp の DNA 断片の増幅が確認できた。 本研究で決定した *S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH の塩基配列とアミノ酸配列を上記のレンサ球菌の配列と比較した結果を図 4 と表 1 に示す。 *S. oralis* の GAPDH は *S. pneumoniae*, *S. gordonii*, *S. pyogenes* および *S. equisimilis* の GAPDH と非常に高い相同性があり, アミノ酸配列で約 90%の相同性が認められた。 また *S. epidermidis*, *S. aureus* および *F. nucleatum* の GAPDH のアミノ酸配列とも約 70%の相同性が認められた。

5. *S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH 遺伝子のサザンハイブリダイゼーション

GAPDH を発現する細菌は複数の GAPDH 遺伝子をもつ可能性がある [1, 18]。 *S. oralis* の GAPDH 遺伝子においてこの可能性を調べるために, プライマーSof2 と Sor2 により PCR 増幅した 909 bp のプローブを使ってサザンハイブリダイゼーションを行った。 *S. oralis* のゲノムのサザンブロット法により, 用いた 10 種類の制限酵素に対していずれも単一のバンドが認められた (図 5)。 この結果から, *S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH 遺伝子は単一のものである可能性が高いことが示された。

6. *P. gingivalis* 線毛と *S. oralis* の pH 調整分泌型 GAPDH との結合

pH を調整することによって GAPDH を精製する Nelson らの方法 [41]により, 本研究でも *S. oralis* ATCC 9811 株から pH 調整分泌型 GAPDH が得られた (図 2A, レーン 3)。 *S. oralis* ATCC 9811 株の pH 調整分泌型 GAPDH はウエスタンブロット法により rFimA と結合することが示された (図 2B, レーン 3)。 さらに, *P. gingivalis* と *S. oralis* の共凝集を濃度依存的に阻害し, 4 μg/ml の濃度で共凝集を完全に阻害した (図 3)。

7. *P. gingivalis* 線毛への *S. oralis* rGAPDH の結合

クローニングした *S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH の塩基配列を基に rGAPDH を作製した。 rGAPDH は約 40kDa の分子量をもち (図 2A, レーン 4), ウエスタンブロット法により rFimA と結合することが示された (図 2B,レーン 4)。 さらに, *P. gingivalis* と *S. oralis* の共凝集を rGAPDH は濃度依存的に阻害し, 2 μg/ml の濃度で共凝集を完全に阻害し, 精製した GAPDH と同程度の阻害活性を示した (図 3)。

8. 位相差顕微鏡像

P. gingivalis と *S. oralis* の共凝集における rGAPDH の阻害効果を, 位相差顕微鏡を用いて

確認した。図 6A に *P. gingivalis* 381 株と *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集像を示す。*S. oralis* rGAPDH (2.5 μg/ml)の添加により, *P. gingivalis* 381 株と *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集はほぼ完全に阻害された (図 6B)。

9. *S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH と *P. gingivalis* rFimA の結合特性の評価

S. oralis ATCC 9811 株の GAPDH と *P. gingivalis* rFimA の結合特性を, 生体分子間相互解析装置 (BIAcore)を用いて解析した。 センサーチップ上に固定化した精製 GAPDH または rGAPDH を, 種々の濃度の rFimA と反応させて得られたセンサーグラムを図 7 に示す。 同センサーグラムをもとに反応速度論的解析を行ったところ, k_{ass} は GAPDH で 2.65×10^{4} $M^{-1}s^{-1}$, rGAPDH で 7.41×10^{4} $M^{-1}s^{-1}$ であり, k_{diss} は GAPDH で 6.11×10^{-4} s^{-1}, rGAPDH で 1.10×10^{-3} s^{-1} であると算出された (表 2)。 親和定数 (K_a)は GAPDH で 4.34×10^{7} M^{-1}, rGAPDH で 6.75×10^{7} M^{-1} と算出されたことから, この結合は高い親和性があることが示された。

10. *P. gingivalis* と種々の口腔レンサ球菌の共凝集活性

供試した 14 菌株の中で 12 菌株の口腔レンサ球菌が *P. gingivalis* 381 株と共凝集した (表 3)。 *S. oralis* ATCC 9811 株と *P. gingivalis* 381 株との共凝集がもっとも強かった。 *S. oralis* ATCC 10557 株, *S. gordonii* G9B 株, *S. sanguinis* ATCC 10556 株および *S. parasanguinis* ATCC 15909 株も *P. gingivalis* 381 株との強い共凝集がみられた。一方, *S. sobrinus* K1-9 株と *S. cricetus* HS-1 株は共凝集がまったくみられなかった。

11. 種々の口腔レンサ球菌の菌体表層 GAPDH 酵素活性

種々の口腔レンサ球菌の菌体表層に存在する GAPDH 発現量を調べるため, 菌体の GAPDH 活性を測定した。 *S. oralis* ATCC 9811 株がもっとも強い菌体表層 GAPDH 活性を示した (7.7×10^{-5} M NADH/min; 表 3)。 *S. oralis* ATCC 10557 株, *S. gordonii* G9B 株, *S. sanguinis* ATCC 10556 株および *S. parasanguinis* ATCC 15909 株の GAPDH 活性もまた, 3.9×10^{-5} M NADH/min 以上と強かった。 一方で, *S. cricetus* HS-1 株と *S. sobrinus* K1-9 株の GAPDH 活性は 1.3×10^{-5} M NADH/min 以下で非常に低かった。 共凝集と菌体表層 GAPDH 活性の結果から, 高い菌体表層 GAPDH 活性をもつレンサ球菌ほど *P. gingivalis* と強く共凝集することが推測された。 そこで, GAPDH 活性と共凝集活性との相関をスピアマンの順位相関係数を用いて統計解析したところ, 有意に高い相関がみられた (図 8 ; $r=0.854$, $P<0.01$)。

12. 種々の口腔レンサ球菌の菌体表層 GAPDH の精製

強い菌体表層 GAPDH 活性および共凝集活性を示した *S. oralis* ATCC 9811 株, *S. oralis* ATCC 10557 株, *S. gordonii* G9B 株, *S. sanguinis* ATCC 10556 株および *S. parasanguinis* ATCC 15909 株の GAPDH を精製し, SDS-PAGE を行ったところ, すべて約 40kDa の分子量を示した。精製した GAPDH はすべてウエスタンブロット法で *P. gingivalis* rFimA と結合した (図 9)。

13. 種々の口腔レンサ球菌の GAPDH の塩基配列とアミノ酸配列の決定

S. oralis ATCC 10557 株, *S. gordonii* G9B 株, *S. sanguinis* ATCC 10556 株および *S. parasanguinis* ATCC 15909 株の GAPDH の塩基配列を決定した。 5 菌株の GAPDH の推定アミノ酸配列のアライメントの結果を図 10 に示す。 5 菌株の GAPDH の相同性は非常に高く, *S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH のアミノ酸配列は *S. oralis* ATCC 10557 株, *S. gordonii* G9B 株, *S. sanguinis* ATCC 10556 株および *S. parasanguinis* ATCC 15909 株の GAPDH アミノ酸配列とそれぞれ 97.6%, 97.0%, 97.0%, 97.6%の相同性を示した (表 1)。

14. *S. oralis* ATCC 9811 株 rGAPDH による種々の口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* 381 株との共凝集阻害効果

上記 5 菌株の GAPDH の相同性は非常に高いことから, 共通する領域が *P. gingivalis* 線毛との結合に関与していることが推測された。 *P. gingivalis* 381 株菌体と上記の口腔レンサ球菌 5 菌株の共凝集に及ぼす *S. oralis* ATCC 9811 株 rGAPDH の共凝集阻害効果を濁度測定法により調べたところ, *S. oralis* ATCC 9811 株の rGAPDH はすべての共凝集を濃度依存的に阻害し, 2 μg/ml の濃度で共凝集を完全に阻害した (図 11)。

考　　察

本研究では, まず, *S. oralis* の共凝集素を同定することを試みた。 超音波処理, CHAPS 処理, 硫安塩析処理そして *P. gingivalis* rFimA と架橋結合したアフィニティカラムクロマトグラフィにより精製した *S. oralis* の共凝集素は N 末端アミノ酸配列とリシルエンドペプチダーゼ処理したペプチド断片の N 末端アミノ酸配列より, 他の菌のもつ GAPDH と相同性が

非常に高いことが示された。 Nelson ら[41]は, *S. gordonii* FSS2 株の GAPDH が pH 6.5 で培養した時には菌体表層にあるが, pH 7.5 で培養するとその 90%以上が菌体外へ分泌されることを報告している。 同じ方法を用いて, 本研究でも *S. oralis* ATCC 9811 株から pH 調整分泌型 GAPDH を得ることができた。 精製した *S. oralis* 共凝集素 (GAPDH)と *S. oralis* pH 調整分泌型 GAPDH を用いて *P. gingivalis* rFimA との結合実験を行った結果, どちらもウエスタンブロット法により rFimA に結合することが示され, さらに, *P. gingivalis* 381 株と *S. oralis* ATCC 9811 株との共凝集を阻害した。 これらの結果から, *S. oralis* の共凝集素は GAPDH であると推測された。 これを確かめるために, 精製した共凝集素のクローニングを行った結果, 精製した共凝集素はこれまでに報告されている細菌の GAPDH と非常に高い相同性を有していることが認められた。 以上の結果より, 本研究で精製した共凝集素は GAPDH であることが明らかとなった。 真正細菌や成熟核の GAPDH の遺伝子型は多様に存在していることが知られているが[13], 本研究で明らかにした *S. oralis* の GAPDH の遺伝子はサザンハイブリダイゼーションの結果から単一のものである可能性が示唆された。

GAPDH は G-3-P をリン酸化し 1,3-ビスホスホグリセリン酸をつくる解糖系の 4 量体の酵素として知られている[53]が, 最近, 酵素機能以外に多様な結合機能を有することが報告されている。 Pancholi ら[44, 45]はグループ A レンサ球菌の GAPDH がフィブロネクチン, リゾチーム, 細胞骨格ミオシンやアクチンに結合すると報告している。 また, グループ A レンサ球菌の GAPDH はプラスミンやプラスミノーゲンにも結合することが報告されている[9, 53]。さらに, *S. aureus* と *S. epidermidis* の菌体表層 GAPDH はトランスフェリンに結合し[35], *Candida albicans* の GAPDH はフィブロネクチンやラミニンに結合する[16]という報告もある。したがって, 本研究で明らかにした口腔レンサ球菌の菌体表層に存在する GAPDH が *P. gingivalis* の線毛との結合に関与していることは, 特に不思議なことではないと考えられる。

本研究では, rFimA と GAPDH の結合特性を, BIAcore を用いて評価した。 多くの抗体抗原反応の K_a 値は 10^6～10^{10} M^{-1} であると報告されている[23, 24]。 本研究での *S. oralis* の精製 GAPDH または rGAPDH と rFimA との結合に対する K_a 値はそれぞれ 4.34×10^7 M^{-1} と 6.75×10^7 M^{-1} であり, 結合が特異的なものであることを示している。 *P. gingivalis* の線毛は上皮細胞, 線維芽細胞, 唾液や細胞外基質タンパク質のようないろいろな成分と結合することが報告されている[4]。 Nakamura ら[40]は *P. gingivalis* の線毛と細胞外基質タンパク質との間の K_a 値はラミニンが 2.15×10^6 M^{-1}, フィブロネクチンが 2.16×10^6 M^{-1}, トロンボスポンディンが 2.26×10^6 M^{-1}, タイプ I 型コラーゲンが 2.76×10^6 M^{-1}, エラスチンが 3.08×10^6 M^{-1} およびビトロネクチンが 3.79×10^6 M^{-1} であると報告している。 また, Amano ら[4]は *P.*

gingivalis の線毛と酸性高プロリンタンパク質, 塩基性高プロリン糖タンパク質, スタセリン, フィブリノーゲンおよびヘモグロビンとの結合に対する K_a 値はそれぞれ 1.63×10^6 M^{-1}, 1.62×10^6 M^{-1}, 1.48×10^6 M^{-1}, 2.16×10^6 M^{-1} および 2.43×10^6 M^{-1} であると報告している。 本研究で得られた K_a 値は上記で報告された値よりも高いことから, *S. oralis* GAPDH と *P. gingivalis* 線毛との結合は高い親和性をもつといえる。

レンサ球菌の GAPDH の相同性が高いことから, 口腔レンサ球菌 14 菌株に対してプライマーSof1 と Sof1 を用いて PCR 法を行ったところ, 14 菌株の口腔レンサ球菌すべてにおいて約 1.1kbp の PCR 産物が得られた (データ省略)。 このことから, 供試したすべての口腔レンサ球菌は相同性が高い GAPDH 遺伝子をもつことが示唆された。 しかし, 14 菌株の口腔レンサ球菌の菌体表層 GAPDH 活性には差が認められた。 本研究では GAPDH の局在性については検討していないが, 口腔レンサ球菌の菌体表層 GAPDH 活性に差があり, かつ菌体表層 GAPDH 活性と共凝集活性との間に有意な相関がみられたことから, 口腔レンサ球菌の表層における GAPDH 発現量が *P. gingivalis* の付着に影響する可能性が考えられる。GAPDH 活性と共凝集活性がともに強い口腔レンサ球菌 4 菌株の GAPDH 塩基配列とアミノ酸配列は *S. oralis* ATCC 9811 株のそれと相同性が非常に高く, これらの口腔レンサ球菌 5 菌株の GAPDH の共通領域が *P. gingivalis* 線毛と結合することが推測される。 この仮定のもとで, 共凝集阻害実験を行ったところ, *S. oralis* ATCC 9811 株 rGAPDH は *P. gingivalis* 381 株と *S. oralis* ATCC 10557 株, *S. gordonii* G9B 株, *S. sanguinis* ATCC 10556 株および *S. parasanguinis* ATCC 15909 株との間の共凝集をすべて濃度依存的に阻害した。 この結果から, 種々の口腔レンサ球菌の GAPDH が同様のメカニズムで *P. gingivalis* の共凝集素として機能していることが示唆される。

P. gingivalis との結合に関与するグラム陽性菌の表層付着因子としては, *A. naeslundii* KWS 81 株の AnAF[54)]と *S. gordonii* G9B 株の SspB[6, 10, 31)]が報告されている。 Yamaguchi ら[54)]は, *A. naeslundii* KWS 81 株菌体の超音波破砕処理により得られた抽出物から精製した AnAF は *A. naeslundii* KWS 81 株菌体と *P. gingivalis* KC 409 株菌体との共凝集を阻害し, その阻害は AnAF を過ヨウ素酸ナトリウムで処理することにより著しく減少することを報告した。 これらの結果は糖タンパク質である AnAF の糖鎖がこの共凝集に関与していることを示唆しており, *P. gingivalis* 381 株菌体と *S. oralis* ATCC 9811 株菌体との共凝集の機序とは異なる。また, Lamont ら[31)]は *S. gordonii* G9B 株の菌体表層にある分子量 170kDa の SspB が *P. gingivalis* 33277 株との結合に関与することを示し, SspB の 1167-1193 アミノ酸残基がその結合に関与していることを報告している[6, 10)]。 *P. gingivalis* は分子量も抗原性も違う 2

種類の線毛 (メジャーとマイナー)を持つことが報告されている[5]。 最近, Chung ら[7]は *S. gordonii* SspB と結合するのは *P. gingivalis* の 100kDa の分子量を持つマイナー線毛複合体であると報告し, *P. gingivalis* のメジャー線毛が *P. gingivalis* と *S. gordonii* との間の初期の結合に関与し, それが SspB とマイナー線毛の結合によって安定されると推測している。 本研究では, 今まで不明であった *P. gingivalis* メジャー線毛と結合する *S. oralis* 共凝集素を同定し, それが GAPDH であることを明らかにし, さらに, *S. oralis* 以外の初期プラーク形成菌にも GAPDH の塩基配列はよく保存されており、*P. gingivalis* メジャー線毛との結合に関与することを示した。

Nyvad ら[42]は初期プラーク形成後, 4 時間以内に, *S. mitis*, *S. sanguinis* および *S. oralis* がレンサ球菌の 60%～90%を占めると報告しており, これら初期プラーク形成レンサ球菌への *P. gingivalis* の付着が歯周ポケットにおける本菌の初期定着に重要な役割を果たしている可能性は高い。 今後, 口腔レンサ球菌に共通する GAPDH の共凝集活性部位を決定することにより, *P. gingivalis* の歯周ポケット内への定着を抑制する阻害剤の開発など歯周病予防のための臨床応用につながる研究への発展も可能となろう。

結　　論

本研究では, *P. gingivalis* 線毛と結合する *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素を同定･精製し, その結合特性を調べるとともに, その遺伝子をクローニングした。 さらに, 種々の口腔レンサ球菌のもつ共凝集素との関連性を検討し, 以下の結論を得た。

1. 免疫沈降法により *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素は 40kDa の分子量を有することが示された。

2. 40kDa の共凝集素を精製し, クローニングした結果, *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素は, すでに報告されているレンサ球菌 (*S. pneumoniae*, *S. gordonii*, *S. pyogenes*, *S. equisimilis*)の GAPDH とは 90%以上の非常に高い相同性を示し, *F. nucleatum* やブドウ球菌 (*S. aureus*, *S. epidermidis*)の GAPDH とも 70%以上の相同性を示したことから, GAPDH であると考えられた。

3. *S. oralis* ATCC 9811 株から精製した GAPDH や rGAPDH と *P. gingivalis* 線毛との結合を BIAcore により解析した結果，高い親和性を示した (GAPDH; K_a=4.34×10^7 M^{-1}, rGAPDH; K_a=6.75×10^7 M^{-1})。

4. 口腔レンサ球菌 14 菌株の菌体表層 GAPDH 活性と共凝集活性との相関を調べた結果，有意に強い相関を示した (r=0.854, P<0.01)。

5. 高い菌体表層 GAPDH 活性と共凝集活性を示した口腔レンサ球菌 4 菌株の GAPDH を精製したところ，すべて約 40kDa の分子量を示した。精製した GAPDH はウエスタンブロット法ですべて rFimA と結合した。 これらの GAPDH の塩基配列を決定したところ，*S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH に対して，97%以上の相同性がみられた。

6. *S. oralis* ATCC 9811 株の rGAPDH は *P. gingivalis* 381 株と供試した口腔レンサ球菌 4 菌株との共凝集を濃度依存的に阻害し，2 μg/ml の濃度で共凝集を完全に阻害した。

以上の結果より，*P. gingivalis* 線毛と結合する *S. oralis* ATCC 9811 株より精製した共凝集素は 40kDa の分子量をもつ GAPDH であることが明らかとなり，*P. gingivalis* の口腔内への新たな定着機構として，*P. gingivalis* 線毛と初期デンタルバイオフィルムを形成する種々の口腔レンサ球菌の GAPDH との結合が重要な役割を果たしている可能性が示された。

謝　　辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えていただき，御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科分子病態口腔科学専攻口腔分子免疫制御学講座(予防歯科学教室)雫石　聰教授に深甚なる謝意を表します。また，本研究の遂行にあたり，直接御指導と御鞭撻を賜りました同予防歯科学教室永田英樹助教授に深く感謝いたします。 さらに，タンパク質のアミノ酸配列決定および遺伝子のクローニングにあたり，御指導と御助言を賜りました国立循環器病センター研究所薬理部南野直人部長ならびに田中純子研究員に心より御礼申し上げます。最後に，本研究の遂行にあたりさまざまな御援助，御協力を頂きました予防歯科学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Alefounder, P. R. and Perham, R. N. (1989) : Identification, molecular cloning and sequence analysis of a gene cluster encoding the Class II fructose 1, 6-biphosphate aldolase, 3-phosphoglycerate kinase and a putative second glyceraldehydes -3-phosphate dehydrogenase of *Escherichia coli. Mol. Microbiol.*, **3**, 723-732.

2) Amano, A., Sojar, H. T., Lee, J.-Y., Sharma, A., Levine, M. J. and Genco, R. J. (1994) : Salivary receptors for recombinant fimbrillin of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.*, **62**, 3372-3380.

3) Amano, A., Fujiwara, T., Nagata, H., Kuboniwa, M., Sharma, A., Sojar, H. T., Genco, R. J., Hamada, S. and Shizukuishi, S. (1997) : *Porphyromonas gingivalis* fimbriae mediate coaggregation with *Streptococcus oralis* through specific domains. *J. Dent. Res.*, **76**, 852-857.

4) Amano, A. (2003) : Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells, Implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodontol.*, **74**, 90-96.

5) Arai, M., Hamada, N. and Umemoto, T. (2000) : Purification and characterization of a novel secondary fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis* strain 381. *FEMS Microbiol. Lett.*, **193**, 75-81.

6) Brooks, W., Demuth, D. R., Gil, S. and Lamont, R. J. **(**1997) : Identification of a *Streptococcus gordonii* SspB domain that mediates adhesion to *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.*, **65**, 3753-3758.

7) Chung, W. O., Demuth, D. R. and Lamont, R. J. **(**2000) : Identification of a *Porphyromonas gingivalis* receptor for the *Streptococcus gordonii* SspB protein. *Infect. Immun.***, 68**, 6758-6762.

8) Cisar, J. O., Kolenbrander, P. E. and McIntire, F. C. (1979) : Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of *Actinomyces viscosus* or *Actinomyces naeslundii*. *Infect. Immun.*, **24**, 742-752.

9) D'Costa, S. S. and Boyle, M. D. (2000) : Interaction of group A streptococci with human plasmin (ogen) under physiological conditions. *Methods*, **21**, 165-177.

10) Demuth, D. R., Irvine, D. C., Costerton, J. W., Cook, G. S. and Lamont, R. J. (2001) : Discrete protein determinant directs the species-specific adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. *Infect. Immun.*, **69**, 5736-5741.

11) Ellen, R. P. and Grove, D. A. (1989) : *Bacteroides gingivalis* vesicles bind to and aggregate *Actinomyces viscosus. Infect. Immun.*, **57**, 1618-1620.

12) Ellen, R. P., Song, M. and Buivids, L. A. (1992) : Inhibition of *Actinomyces viscosus-Porphyromonas gingivalis* coadhesion by trypsin and other proteins. *Oral Microbiol. Immunol.*, **7**, 198-203.

13) Figge, R. M., Schubert, M., Brinkmann, H. and Cerff, R. (1999) : Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase gene diversity in eubacteria and eukaryotes, Evidence for intra- and inter-kingdom gene transfer. *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 429-440.

14) Gase, K., Gase, A., Schirmer, H. and Malke, H. (1996) : Cloning, sequencing and functional overexpression of the *Streptococcus equisimilis* H46A gapC gene encoding a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase that also functions as a plasmin(ogen)-binding protein. Purification and biochemical characterization of the protein. *Eur. J. Biochem.*, **239**, 42-51.

15) Goulbourne, P. A. and Ellen, R. P. (1991) : Evidence that *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus. J. Bacteriol.*, **173**, 5266-5274.

16) Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorin, I., Renau-Piqueras, I., Martinez, J. P. and Gil, M. L. (1998) : The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect. Immun.*, **66**, 2052-2059.

17) Hiratsuka, K., Abiko, Y., Ito, T., Sasahara, H. and Takiguchi, H. (1992) : Role of *Porphyromonas gingivalis* 40-kDa outer membrane protein in the aggregation of *P. gingivalis* vesicles and *Actinomyces viscosus*. *Arch. Oral Biol.*, **37**, 717-724.

18) Holland, J. P. (1983) : Homologous nucleotide sequence at the 5' termini of messenger RNAs synthesized from the yeast enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene families. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5291-5299.

19) Isogai, H., Isogai, E., Yoshimura, F., Suzuki, T., Kagota, W. and Takano, K. (1988) : Specific inhibition of adherence of an oral strain of *Bacteroides gingivalis* 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. *Arch. Oral Biol.*, **33**, 479-485.

20) Jenkinson, H. F. and Demuth, D. R. (1997) : Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/lI polypeptides. *Mol. Microbiol.*, **23**, 183-190.

21) Kamaguchi, A., Baba, H., Hoshi, M. and Inomata, K. (1995) : Effect of *Porphyromonas*

gingivalis ATCC 33277 vesicle on adherence of *Streptococcus mutans* OMZ 70 to the experimental pellicle. *Microbiol. Immunol.*, **39**, 521-524.

22) Kapatral, V., Anderson, I., Ivanova, N., Reznik, G., Los, T., Lykidis, A., Bhattacharyya, A., Bartman, A., Gardner, W., Grechkin, G., Zhu, I., Vasieva, O., Chu, L., Kogan, Y., Chaga, O., Goltsman, E., Bernal, A., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Kyrpides., N. and Overbeek, R. (2002) : Genome sequence and analysis of the oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586. *J. Bacteriol.*, **184**, 2005-2018.

23) Karlsson, R. and Falt, A. (1997) : Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors. *J. Immunol. Methods*, **200**, 121-133.

24) Khilko, S. N., Jelonek, M. T., Corr, M., Boyd, L. F., Bothwell, A. L. and Margulies, D. H. (1995) : Measuring interactions of MHC class I molecules using surface plasmon resonance. *J. Immunol. Method*, **183**, 77-94.

25) Kolenbrander, P. E. (2000) : Oral microbial communities: Biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 413-437.

26) Kontani, M., Ono, H., Shibata, H., Okamura, Y., Tanaka, T., Fujiwara, T., Kimura, S. and Hamada, S. (1996) : Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins. *Infect. Immun.*, **64**, 756-762.

27) Kuboniwa, M., Amano, A. and Shizukuishi, S. (1998) : Hemoglobin-binding protein purified from *Porphyromonas gingivalis* is identical to lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **249**, 38-43.

28) Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (*London*), **227**, 680-685.

29) Lamont, R. J., Hersey, S. G. and Rosan, B. (1992) : Characterization of the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.*, **7**, 193-197.

30) Lamont, R. J., Bevan, C. A., Gil, S., Persson, R. E. and Rosan, B. (1993) : Involvement of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in adherence to *Streptococcus gordonii. Oral Microbiol. Immunol.*, **8**, 272-276.

31) Lamont, R. J., Gil, S., Demuth, D. R., Malamud, D. and Rosan, B. (1994) : Molecules of *Streptococcus gordonii* that bind to *Porphyromonas gingivalis. Microbiology*, **140**, 867-872.

32) Li, J. and Ellen, R. P. (1989) Relative adherence of *Bacteroides* species and strains to *Actinomyces viscosus* on saliva-coated hydroxyapatite. *J. Dent. Res.*, **68**, 1308-1312.

33) Li, J., Ellen, R. P., Hoover, C. I. and Felton, J. R. (1991) : Association of proteases of *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* with its adhesion to *Actinomyces viscosus. J. Dent. Res.*, **70**, 82-86.

34) Mayland, D. and Holt, S. C. (1988) : Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.*, **52**, 134-152.

35) Modun, B. and Williams, P. (1999) : The staphylococcal transferring-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosophate dehydrogenase. *Infect. Immun.*, **67**, 1086-1092.

36) Nagata, H., Murakami, Y., Inoshita, E., Shizukuishi, S. and Tsunemitsu, A. (1990) : Inhibitory effect of human plasma and saliva on co-aggregation between *Bacteroides gingivalis* and *Streptococcus mitis*. *J. Dent. Res.* , **69**, 1476-1479.

37) Nagata, H., Amano, A., Hanioka, T., Tamagawa, H., Shizukuishi, S. and Miyata, T. (1993) : Inhibition of coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis* by fibrinogen fragments. *FEMS Microbiol. Lett.*, **114**, 31-36.

38) Nagata, H., Sharma, A., Sojar, H. T., Amano, A., Levine, M. J. and Genco, R. J. **(**1997) : Role of the carboxyl-terminal region of *Porphyromonas gingivalis* fimbrillin in binding to salivary proteins. *Infect. Immun.*, **65**, 422-427.

39) Naito, Y., Tohda, H., Okuda, K. and Takazoe, I. (1993) : Adherence and hydrophobicity of invasive and noninvasive strains of *Porphyromonas gingivalis. Oral Microbiol. Immunol.*, **8**, 195-202.

40) Nakamura, T., Amano, A., Nakagawa, I. and Hamada, S. (1999) : Specific interactions between *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and human extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol. Lett.*, **175**, 267-272.

41) Nelson, D., Goldstein, J. M., Boatright, K., Harty, D. W., Cook, S. L., Hickman, P. J., Potempa, J., Travis, J. and Mayo, J. A. (2001) : pH-regulated secretion of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus gordonii* FSS2, Purification, characterization, and cloning of the gene encoding this enzyme. *J. Dent. Res.*, **80**, 371-377.

42) Nyvad, B. and Kilian, M. (1990) : Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.*, **24**, 267-272.

43) Okuda, K. (1993) : Attachment mechanisms and colonization, p. 139-157. *In*, Shah, H. N., Mayland, D. and Genco, R. J. (ed.) Biology of the species *Porphyromonas gingivalis*. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.

44) Pancholi, V. and Fischetti, V. A. (1992) : A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.*, **176**, 415-426.

45) Pancholi, V. and Fischetti, V. A. (1993) : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on the surface of group A streptococci is also an ADP-ribosylating enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8154-8158.

46) Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E. and Handley, P. S. (2003) : Bacterial coaggregation, an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* , **11**, 94-100.

47) Schwarz, S., Ellen, R. P. and Grove, D. A. (1987) : *Bacteroides gingivalis* - *Actinomyces viscosus* cohesive interactions as measured by a quantitative binding assay. *Infect. Immun.* , **55**, 2391-2397.

48) Slots, J. and Genco, R. J. (1984) : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease, Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J. Dent. Res.*, **63**, 412-421.

49) Slots, J. and Gibbons, R. J. (1978) : Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. *Infect. Immun.*, **19,** 254-264.

50) Stinson, M. W., Safulko, K. and Levine, M. J. (1991) : Adherence of *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* to *Streptococcus sanguis* in vitro. *Infect. Immun.*, **59**, 102-108.

51) Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R. T., Haft, D. H., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Umayam, L. A., White, O., Salzberg, S. L., Lewis, M. R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A. M., Utterback, T. R., Hansen, C. L., McDonald, L. A., Feldblyum, T. V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E. K., Holt, L. E., Loftus, B. J., Yang, F., Smith, H. O., Venter, J. C., Dougherty, B. A., Morrison, D. A., Hollingshead, S. K. and Fraser, C. M. (2001) : Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science*, **293**, 498-506.

52) van Winkelhoff, A. J., van der Velden, U. and de Graaff, J. (1987) : Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J. Clin. Periodontol.*, **15**, 116-122.

53) Winram, S. B. and Lottenberg, R. (1996) : The plasmin-binding protein Plr of group A streptococci is identified as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Microbiology*, **142**, 2311-2320.

54) Yamaguchi, T., Kasamo, K., Chuman, M., Machigashira, M., Inoue, M. and Sueda, T. (1998) : Preparation and characterization of an *Actinomyces naeslundii* aggregation factor that mediates coaggregation with *Porphyromonas gingivalis. J. Periodontal Res.*, **33**, 460-468.

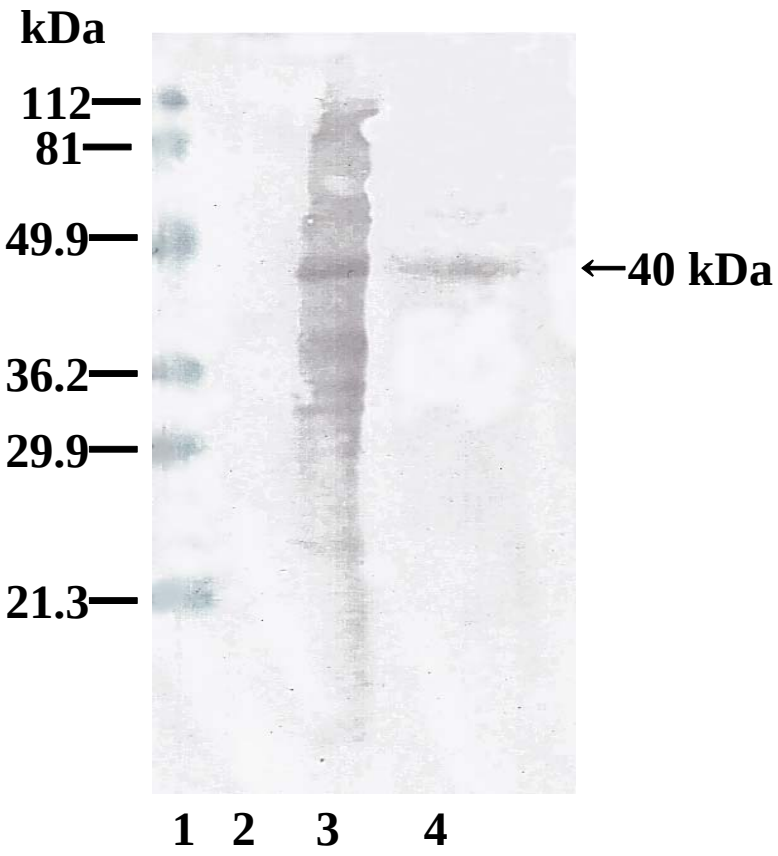


図1　免疫沈降法による*S. oralis* ATCC 9811株の共凝集素の同定

1: 分子量マーカー

2: ビオチンラベルしていない*S. oralis*菌体表層成分粗標品

3: ビオチンラベルした*S. oralis*菌体表層成分粗標品

4: rFimAと結合した*S. oralis*菌体表層成分

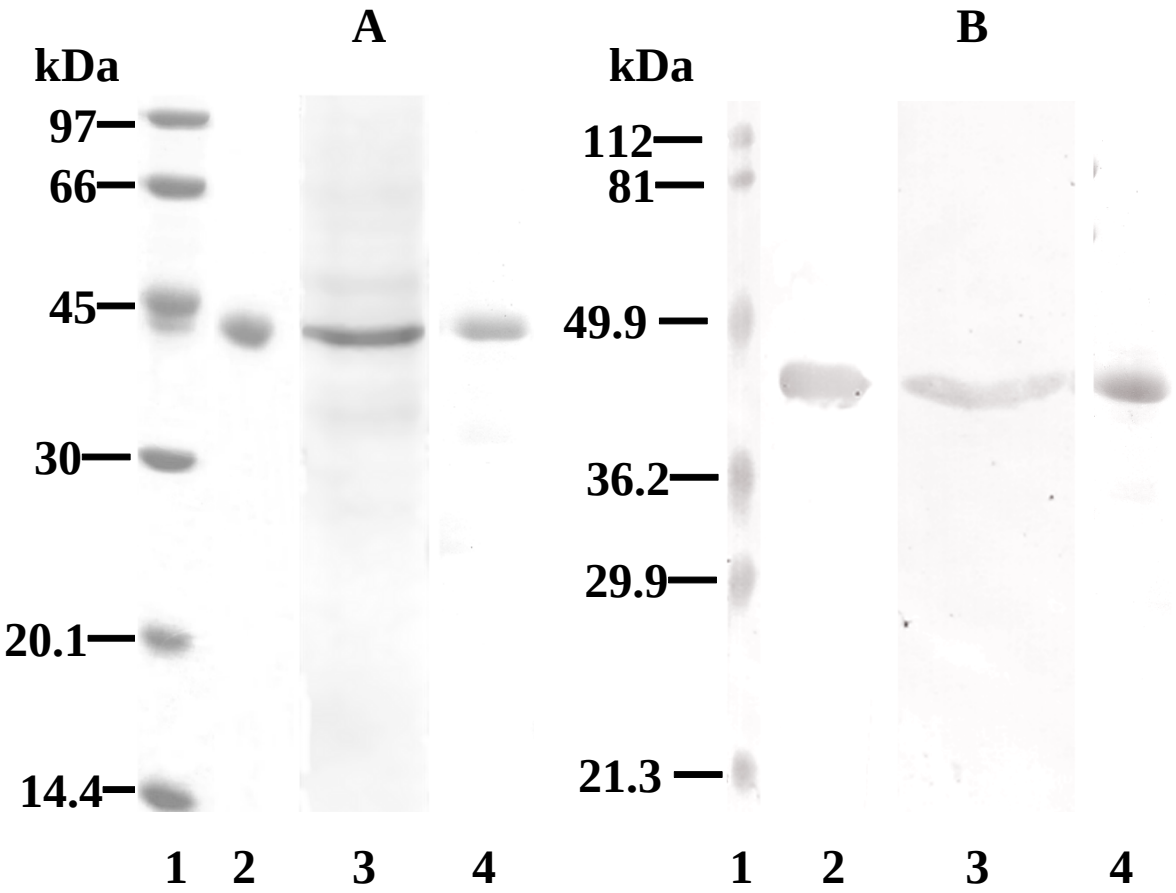


図2 *S. oralis* ATCC 9811株の精製共凝集素, pH調整分泌型GAPDH, rGAPDHのCBB染色像とウエスタンブロット

(A:CBB染色, B:ウエスタンブロット)

1: 分子量マーカー

2: 精製共凝集素

3: pH調整分泌型GAPDH

4: rGAPDH

表1　*S. oralis* GAPDH の塩基配列 とアミノ酸配列の相同性検索

菌種		相同性(%)	
		塩基配列	アミノ酸配列
Streptococcus oralis	ATCC 9811	100	100
Streptococcus pneumoniae	TIGR4	97	99
Streptococcus oralis	ATCC 10557	96	98
Streptococcus parasanguinis	ATCC15909	95	98
Streptococcus sanguinis	ATCC 10556	95	97
Streptococcus gordonii	FSS2	93	97
Streptococcus gordonii	G9B	93	97
Streptococcus pyogenes	M1 GAS	89	92
Streptococcus equisimilis	H46A	88	88
Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228	71	70
Staphylococcus aureus	N315	71	70
Fusobacterium nucleatum	ATCC 25586	66	71

表2　BIAcoreによる*S. oralis* GAPDHと*P. gingivalis*線毛との結合特性の解析

リガンド	アナライト	$k_{ass}(M^{-1}s^{-1})$	$k_{diss}(s^{-1})$	$K_a(M^{-1})$
S. oralis GAPDH	rFimA	2.65×10^{4}	6.11×10^{-4}	4.34×10^{7}
S. oralis rGAPDH	rFimA	7.41×10^{4}	1.10×10^{-3}	6.75×10^{7}

表3　種々の口腔レンサ球菌の*P. gingivalis*との共凝集活性および菌体表層GAPDH活性

菌種	共凝集活性	GAPDH 活性(10^{-5}M NADH /min) *
S. oralis ATCC 9811	4	7.7 ± 1.2
S. oralis ATCC 10557	3	3.9 ± 0.6
S. gordonii G9B	3	5.8 ± 0.9
S. sanguinis ATCC 10556	3	4.1 ± 0.4
S. parasanguinis ATCC 15909	3	5.8 ± 0.9
S. sobrinus B-13	2	2.1 ± 1.2
S. sobrinus 6715	2	3.2 ± 0.5
S. salivarius OMZ 65	1	2.6 ± 0.1
S. salivarius HHT	1	3.3 ± 1.3
S. mutans MT 8148	1	3.4 ± 2.1
S. cricetus HS-6	1	3.1 ± 0.4
S. milleri NCTC 10703	1	2.6 ± 0.4
S. sobrinus K1-9	0	1.3 ± 0.6
S. cricetus HS-1	0	0.4 ± 0.2

* 平均値±標準偏差（n=3)

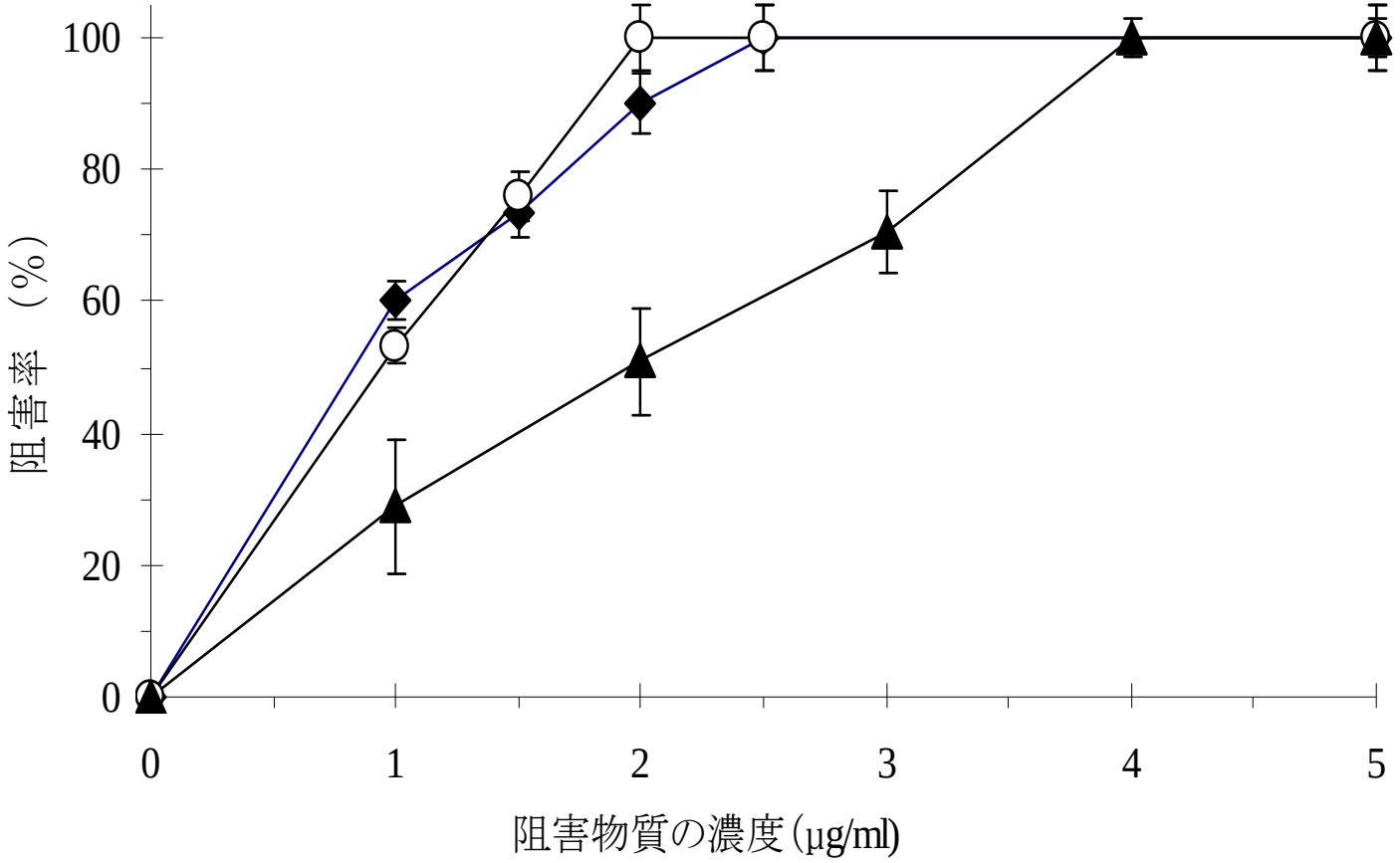


図3　*S. oralis* ATCC 9811株の精製共凝集素, pH調整分泌型GAPDHおよびrGAPDHによる *P. gingivalis* 381株と*S. oralis* ATCC 9811株との共凝集の阻害効果　(n=3;各値は平均値±標準偏差を示す)

◆：精製共凝集素, ▲： pH調整分泌型GAPDH, ○： rGAPDH

```
S.pneumoniae      1 MICSDSSYSFHNKNFMIFIRRKSLMVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLT   60
S.pyogenes        1 -------------------------MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNIEGVEVTRINDLT   36
S.gordonii        1 ----------------------------KVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLT   33
S.equisimilis     1 -------------------------MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLT   36
S.oralis          1 -------------------------MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLT   36
                                             ...********************.************

S.pneumoniae     61 DPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEVKEGGFEVNGKFIKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEA   120
S.pyogenes       37 DPNMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEVKEGGFEVNGNFIKVSAERDPENIDWATDGVEIVLEA    96
S.gordonii       34 DPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEVKEGGFEVNGKFVKVSAERDPENIDWANDGVEIVLEA    93
S.equisimilis    37 DPNMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEVKEGGFEVNGNFIKVSAERDPENIDWATDGVEIVLEA    96
S.oralis         37 DPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEVKEGGFEVNGKFVKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEA    96
                    **.*******************************.*.**********.****.**********

S.pneumoniae    121 TGFFAKKEAAEKHLK-GGAKKVVITAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNC   179
S.pyogenes       97 TGFFAKKEAAEKHLHANGAKKVVITAPGGNDVKTVVFNTNHDILDGTETVISGASCTTNC   156
S.gordonii       94 TGFFATKAAAEKHLHAGGAKKVVITAPGGSDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNC   153
S.equisimilis    97 TGFFAKKEAAEKPLHANGAKKVVITAPGGNDVKQLFSTLTTSILDGTETVISGASCTTNC   156
S.oralis         97 TGFFAKKAAAEKHLHAGGAKKVVITAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNC   156
                    *****.*.****.*...************.***.........******************

S.pneumoniae    180 LAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHAYTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAANIVPNSTGAAK   239
S.pyogenes      157 LAPMAKALHDAFGIQKGLMTTIHAYTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAANIVPNSTGAAK   216
S.gordonii      154 LAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHAYTGDQMVLDGPHRKGDLRRARAAAANIVPNSTGAAK   213
S.equisimilis   157 LAPMAKALHDAFGIQKGLMTTIHAYTGDQMIVDGHRGGGDLRRARAGAANIVPNSTGARK   216
S.oralis        157 LAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHAYTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAANIVPNSTGAAK   216
                    ********.*.**...***************..**....********.***********.*

S.pneumoniae    240 AIGLVIPELNGKLDGSAQRVPTPTGSVTELVAVLEKNVTVDEVNAAMKAASNESYGYTED   299
S.pyogenes      217 AIGLVIPELNGKLDGAAQRVPVPTGSVTELVVTLDKNVSVDEINAAMKAASNDSFGYTED   276
S.gordonii      214 AIGLVIPELNGKLDGAAQRVPVPTGSVTELVAVLDKNVTVDEVNAAMKAASNESYGYTED   273
S.equisimilis   217 AIGLVIPELNGKLDGAAQRVPVPTGSVTELVVTLDKNVSVDEINAAMKAASNDSFGYTED   276
S.oralis        217 AIGLVIPELNGKLDGSAQRVPTPTGSVTELVAVLEKNVTVDEVNAAMKAASNESYGYTED   276
                    ****************.*****.**********.*.***.***.**********.*.*****

S.pneumoniae    300 PIVSSDIVGMSYGSLFDATQTKVLDVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK   359
S.pyogenes      277 PIVSSDIVGVSYGSLFDATQTKVMEVDGSQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK   336
S.gordonii      274 PIVSSDIVGMAYGSLFDATQTKVLDVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQ-------------   320
S.equisimilis   277 PIVSSDIVGVSYGSLFDATQTKVMEVDGSQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK   336
S.oralis        277 PIVSSDIVGMSYGSLFDATQTKVLDVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK   336
                    **********.**************.**.***.*******************............
```

図 4　*S. oralis* GAPDH と種々のレンサ球菌 GAPDH とのアミノ酸配列アライメント

配列欠損部位はー, 5 菌株すべてで配列が同じ部位は＊, 3 菌株ないし 4 菌株で配列が同じ部位は . で示した。灰色領域は N 末端配列アミノ酸やリシルエンドペプチダーゼ処理断片の N 末端アミノ酸シーケンス部位を示した。

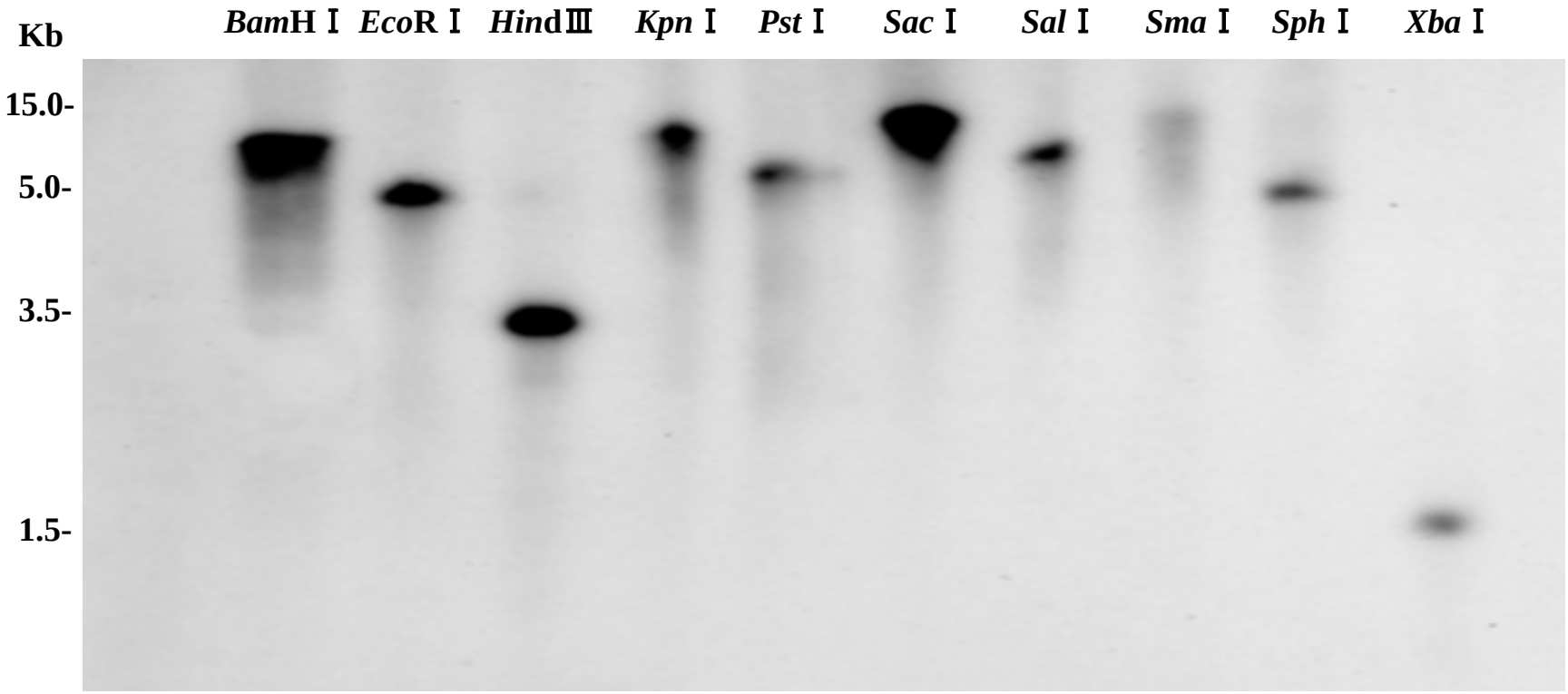


図5　*S. oralis* ATCC 9811株のGAPDH遺伝子のサザンハイブリダイゼーション

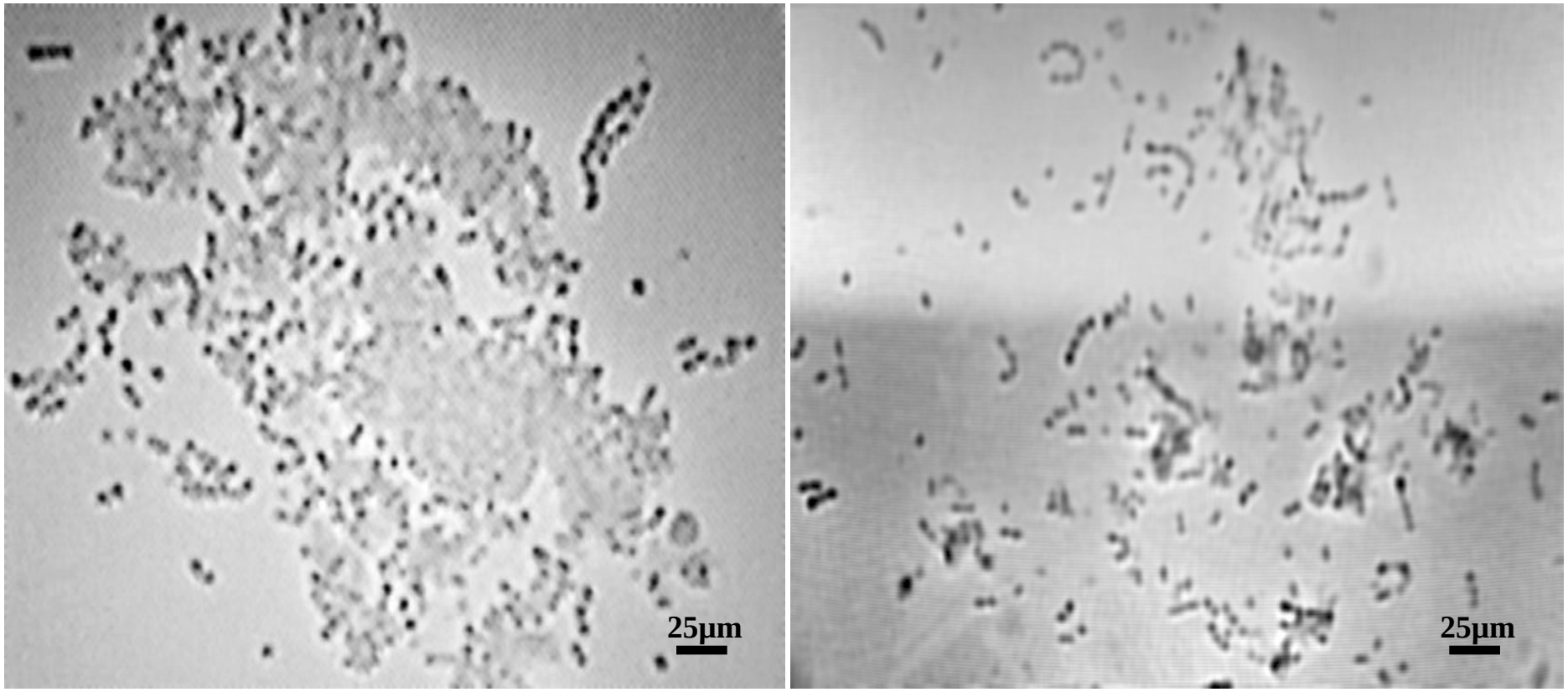


図6 *P. gingivalis* 381株と*S. oralis* ATCC 9811株の共凝集の位相差顕微鏡像
(A) *P. gingivalis* 381株と*S. oralis* ATCC 9811株の共凝集像
(B) *S. oralis* rGAPDH(2.5 μg/ml)の添加によるほぼ完全な共凝集阻害像

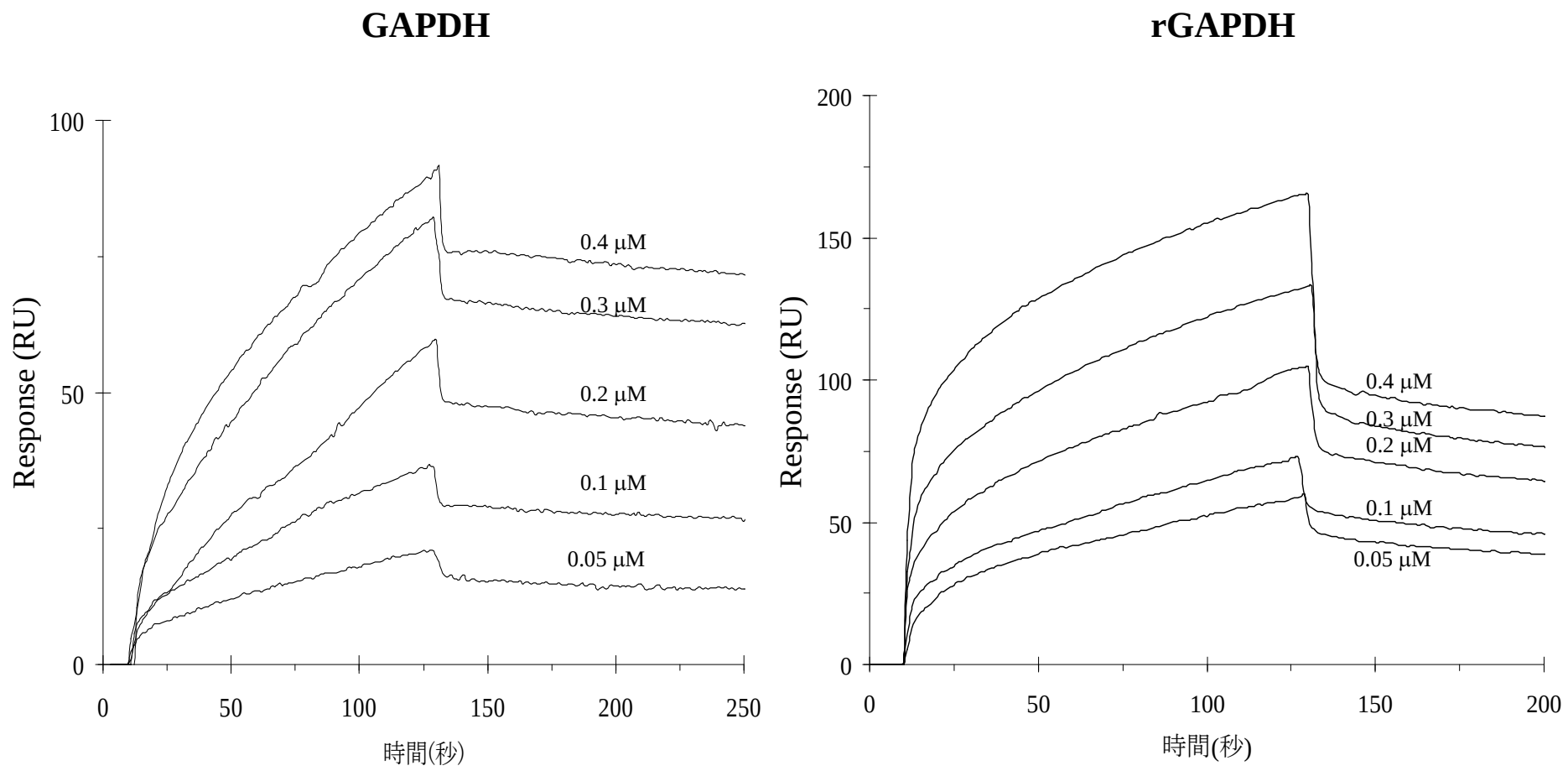


図7　*S. oralis* GAPDHに対するrFimAの結合を示すセンサーグラム

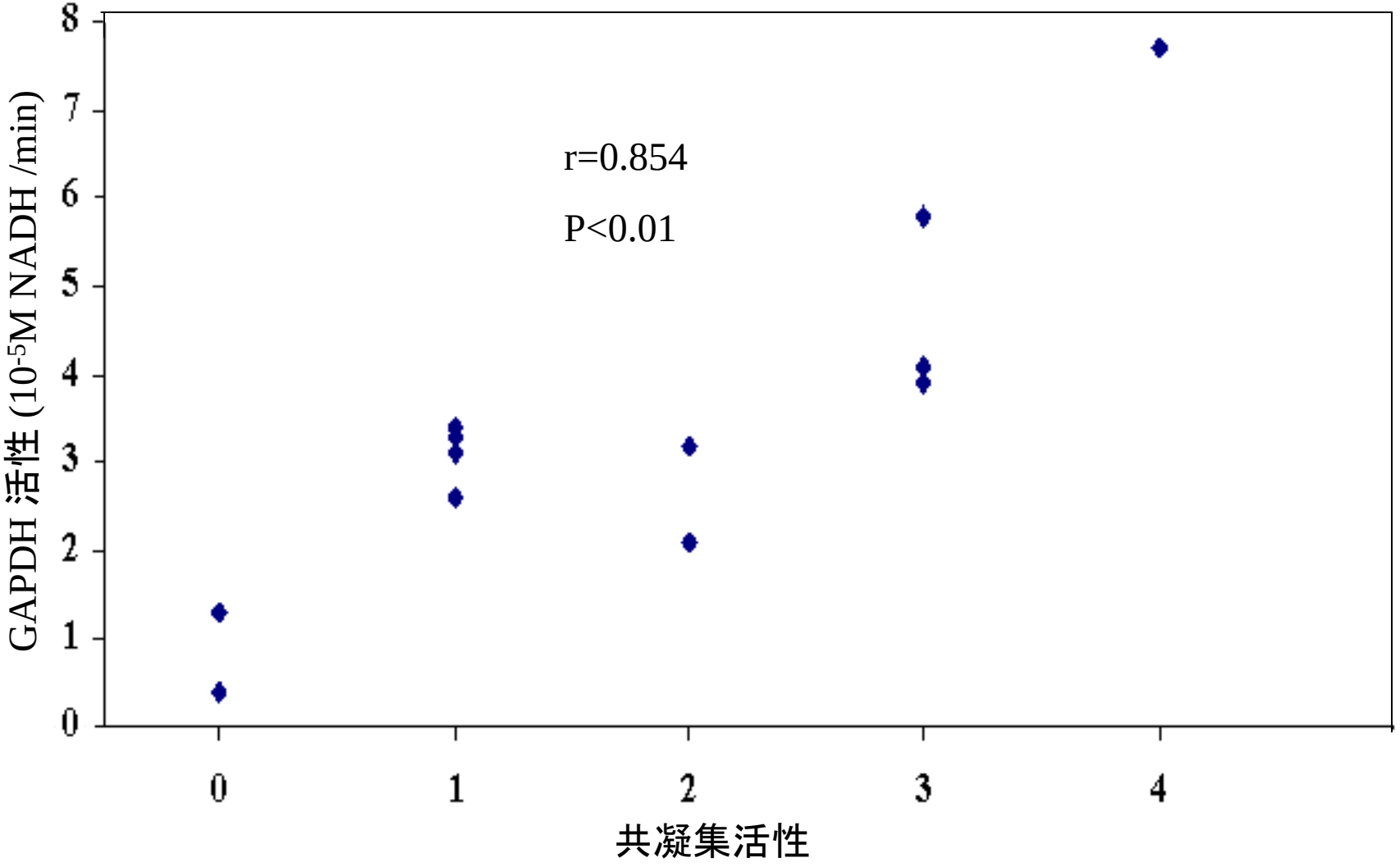


図8　レンサ球菌の菌体表層GAPDH活性と*P.gingivalis* 381株との共凝集活性との相関

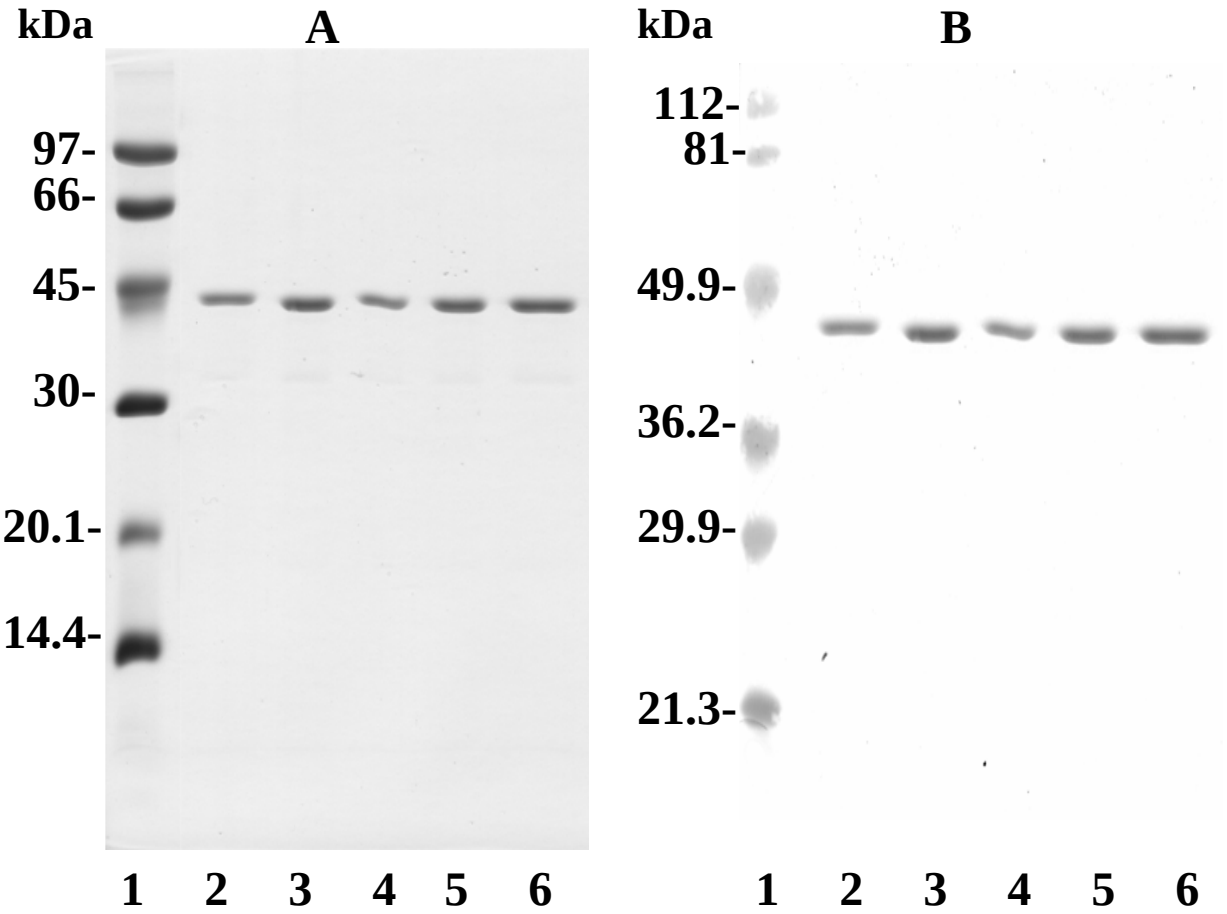
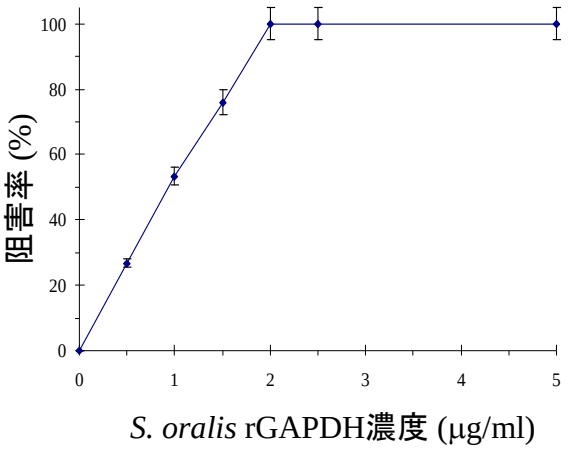


図9 口腔レンサ球菌5菌株の菌体表層GAPDHのCBB染色像とウエスタンブロット
(A:CBB染色, B:ウエスタンブロット)
1:分子量マーカー　2: *S. oralis* ATCC 9811株　3: *S. oralis* ATCC 10557株
4: *S. gordonii* G9B株　5: *S. sanguinis* ATCC 10556株　6: *S. parasanguinis* ATCC 15909株

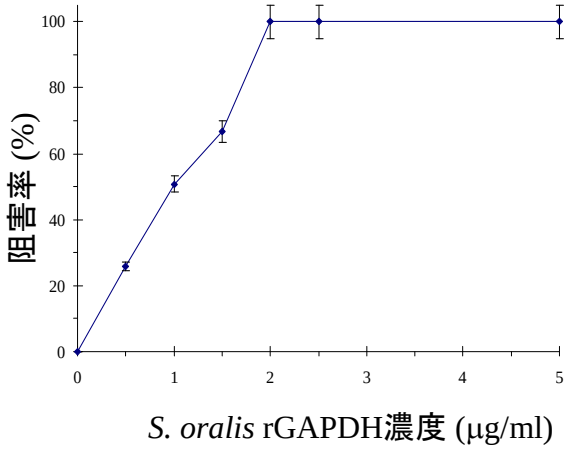
```
S.oralis ATCC 9811              1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
S.oralis ATCC 10557             1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
S.gordonii G9B                  1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
S.sanguinis ATCC 10556          1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
S.parasanguinis ATCC 15909      1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
                                  ************************************************************

S.oralis ATCC 9811             61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEATGFFAKKAAAEKHLHAGGAKKVVI   120
S.oralis ATCC 10557            61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEATGFFAKKDAAEKHLK-GGAKKVVI   119
S.gordonii G9B                 61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPENIDWANDGVEIVLEATGFFATKAAAEKHLHAGGAKKVVI   120
S.sanguinis ATCC 10556         61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEATGFFAKKDAAEKHLK-GGAKKVVI   119
S.parasanguinis ATCC 15909     61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEATGFFAKKDAAEKHLK-GGAKKVVI   119
                                  **********************.****.**************.*.******.  ********

S.oralis ATCC 9811            121 TAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   180
S.oralis ATCC 10557           120 TAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   179
S.gordonii G9B                121 TAPGGSDVKTVVFNTNHDILDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   180
S.sanguinis ATCC 10556        120 TAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   179
S.parasanguinis ATCC 15909    120 TAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   179
                                  *****.************.******************************************

S.oralis ATCC 9811            181 YTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAANIVPNSTGAAKAIGLVIPELNGKLDGSAQRVPTPT   240
S.oralis ATCC 10557           180 YTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAVNIVPNSTGAAKAIGLVIPELNGKLDGAAQRVPVPA   239
S.gordonii G9B                181 YTGDQMILDGPHRKGDLRRARAGAANIVPNSTGAAKAIGLVIPELNGKLDGAAQRVPTPT   240
S.sanguinis ATCC 10556        180 YTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAVNIVPNSTGAAKAIGRVIPELNGKLDGAAQRVPVPA   239
S.parasanguinis ATCC 15909    180 YTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAVNIVPNSTGAAKAIGRVIPELNGKLDGAAQRVPVPA   239
                                  **************.**********.***************.************.*****.*.

S.oralis ATCC 9811            241 GSVTELVAVLEKNVTVDEVNAAMKAASNESYGYTEDPIVSSDIVGMSYGSLFDATQTKVL   300
S.oralis ATCC 10557           240 GSVTELVAVLEKSVTVDEVNAAMKAASNESYGYTEDPIVSSDILGMSYGSLFDATQTKVL   299
S.gordonii G9B                241 GSVTELVVVLEKNVTVDEVNAAMKAVANESYGYTEDPIVSSDVVGMSYGSLFDATQTKVL   300
S.sanguinis ATCC 10556        240 GSVTELVAVLEKSVTVDEVNAAMKAASNESYGYTEDPIVSSDILGMSYGSLFDATQTKVL   299
S.parasanguinis ATCC 15909    240 GSVTELVAVLEKSVTVDEVNAAMKAASNESYGYTEDPIVSSDILGMSYGSLFDATQTKVL   299
                                  *******.****.************..***************..*****************

S.oralis ATCC 9811            301 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           336
S.oralis ATCC 10557           300 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           335
S.gordonii G9B                301 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           336
S.sanguinis ATCC 10556        300 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           335
S.parasanguinis ATCC 15909    300 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           335
                                  ************************************
```

図 10　*S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH と口腔レンサ球菌 4 菌株 GAPDH とのアミノ酸配列アライメント
配列欠損部位はー, 5 菌株すべてで配列が同じ部位は＊, 3 菌株ないし 4 菌株で配列が同じ部位は ．で示した。

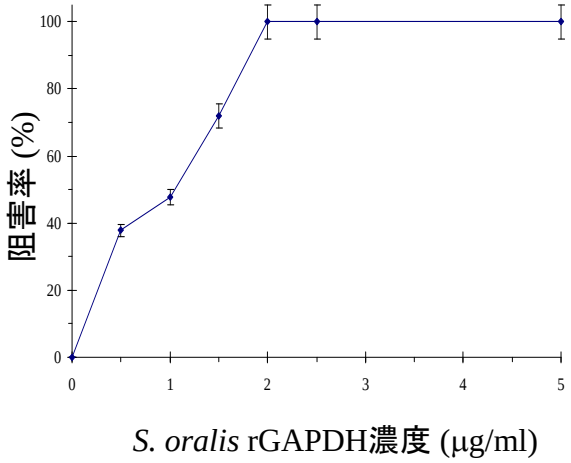
S. oralis ATCC 9811株



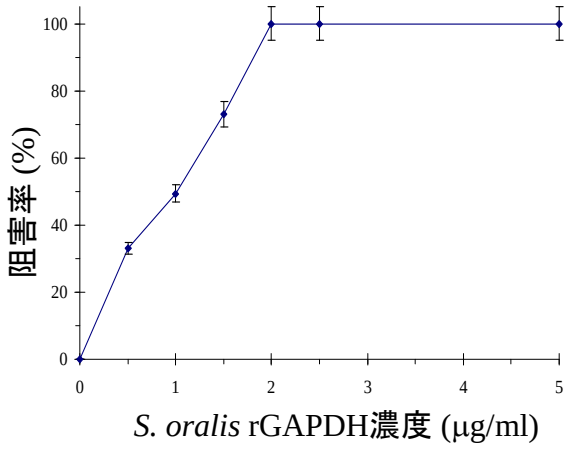
S. oralis ATCC 10557株



S. gordonii G9B株



S. parasanguinis ATCC 15909株



S. sanguinis ATCC 10556株

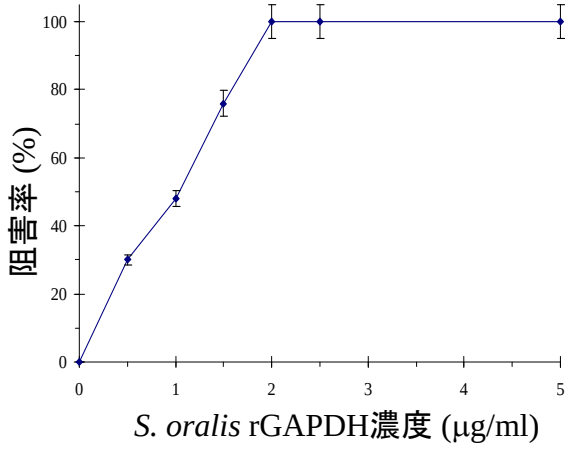


図11 *S. oralis* ATCC 9811株rGAPDHによる*P. gingivalis* 381株と種々の口腔レンサ球菌との共凝集阻害(n=3;各値は平均値±標準偏差を示す)

図の説明

図 1　免疫沈降法による *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素の同定

S. oralis ATCC 9811 株菌体を *N*-ヒドロキシサクシンイミドビオチン (3 mg/10^{10} 個)により標識した後、超音波処理した上清画分 (150 μg)を rFimA (50 μg)と反応させた。 ウサギ抗 rFimA ポリクローナル抗体 IgG (1:500)を添加し Affi-Gel プロテイン A アガロースビーズ (10 μg)とともに振盪した。 結合成分を SDS-PAGE 緩衝液で抽出・展開後, ニトロセルロース膜に転写した後, *P. gingivalis* rFimA と結合した *S. oralis* ATCC 9811 株菌体表層成分をアビジン-HRP Conjugate と HRP Conjugate Substrate Kit を用いて検出した。 レーン 1, 分子量マーカー レーン 2, ビオチンラベルしていない *S. oralis* 菌体表層成分粗標品 レーン 3, ビオチンラベルした *S. oralis* 菌体表層成分粗標品 レーン 4, rFimA と結合した *S. oralis* 菌体表層成分

図 2　*S. oralis* ATCC 9811 株の精製共凝集素, pH 調整分泌型 GAPDH, rGAPDH の CBB 染色像とウエスタンブロット

標品 (5 μg)を SDS-PAGE (12.5%ゲル)後, ニトロセルロース膜に転写した後, 膜は rFimA (1 mg/ml)と反応させ, ウサギ抗 rFimA ポリクローナル抗体 IgG と HRP conjugate-ヒツジ抗ウサギ抗体 IgG に反応させた。 結合した rFimA を HRP Conjugate Substrate Kit を用いて検出した。 (A) CBB 染色 (B) ウエスタンブロット レーン 1, 分子量マーカー レーン 2, 精製共凝集素 レーン 3, pH 調整分泌型 GAPDH　レーン 4, rGAPDH

図 3　*S. oralis* ATCC 9811 株の精製共凝集素, pH 調整分泌型 GAPDH および rGAPDH による *P. gingivalis* 381 株と *S. oralis* ATCC 9811 株との共凝集の阻害効果

10 mM PBS (pH 6.0) 2 ml の反応液中に 5×10^8 個の *P. gingivalis* 381 株菌体と 5×10^8 個の *S. oralis* ATCC 9811 株菌体および濃度依存的に阻害物質を加え, 分光光度計を用いて 37℃で攪拌しながら,吸光度 (A_{550})の変化を計測した。共凝集阻害率は下記の計算式に基づき算出した。阻害率 (%)＝｛(A-B) ÷ A｝×100　(A: 阻害物質を添加しない時の共凝集活性, B: 阻害物質を添加した時の共凝集活性)　(n=3;各値は平均値±標準偏差を示す) ◆, 精製共凝集素　▲, pH 調整分泌型 GAPDH ○, rGAPDH

図 4　　*S. oralis* GAPDH と種々のレンサ球菌 GAPDHs とのアミノ酸配列アライメント

S. oralis ATCC 9811 株の GAPDH の推定アミノ酸配列を他のレンサ球菌の GAPDHs の推定アミノ酸配列と比較した。 配列欠損部位は- , 5 菌株すべてで配列が同じ部位は*, 3 菌株ないし 4 菌株で配列が同じ部位は ． で示した。灰色領域は N 末端配列アミノ酸やリシルエンドペプチダーゼ処理断片の N 末端アミノ酸シーケンス部位を示す。

図 5　　*S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH 遺伝子のサザンハイブリダイゼーション

S. oralis ATCC 9811 株のゲノム (4 μg)を GAPDH 遺伝子配列内で切断部位のない 10 種類の制限酵素 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*I および *Xba*I で処理し, アガロース電気泳動後, ナイロンメンブレンに転写し, DIG ラベルした GAPDH プローベにより GAPDH 遺伝子を検出した。検出は DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II を用いて行った。

図 6　*P. gingivalis* 381 株と *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集の位相差顕微鏡像

(A)　*P. gingivalis* 381 株と *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集像

(B)　*S. oralis* rGAPDH(2.5 μg/ml)の添加によるほぼ完全な共凝集阻害像

図 7　　*S. oralis* GAPDH に対する rFimA の結合を示すセンサーグラム

P. gingivalis の rFimA と *S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH との結合特性の評価は生体分子間相互作用解析装置 BIAcore2000 により行った。GAPDH を固定化した CM5 センサーチップと 0.05 μM から 0.4 μM までの 5 段階に濃度を調整した rFimA を反応させた。

図 8　レンサ球菌の菌体表層 GAPDH 活性と *P. gingivalis* 381 株との共凝集活性との相関

P. gingivalis 381 株と口腔レンサ球菌 14 菌株との間の共凝集活性は肉眼にて 5 段階で判定した。レンサ球菌の菌体表層 GAPDH 活性は口腔レンサ球菌 14 菌株の各菌懸濁液を G-3-P と 40 mM のトリエタノールアミン, 50 mM リン酸一水素ナトリウム, 5 mM EDTA (pH 8.6) および NAD^+と混合し NAD^+から NADH への変化量を測定した。

図 9　　口腔レンサ球菌 5 菌株の菌体表層 GAPDH の CBB 染色像とウエスタンブロット

ウエスタンブロット法は精製 GAPDH を SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に転写し、rFimA と反応させ、結合した rFimA を抗 rFimA 抗体を用いて検出した。(A)CBB 染色 (B)

ウエスタンブロット　レーン 1, 分子量マーカー　レーン 2, *S. oralis* ATCC 9811 株　レーン 3:　*S. oralis* ATCC 10557 株 レーン 4, *S. gordonii* G9B 株　レーン 5, *S. sanguinis* ATCC 10556 株　レーン 6, *S. parasanguinis* ATCC 15909 株

図 10　*S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH と口腔レンサ球菌 4 菌株 GAPDH とのアミノ酸配列アライメント

レンサ球菌 5 菌株の遺伝子配列を本研究にて決定し, 推定アミノ酸配列を比較した。 配列欠損部位は- , 5 菌株すべてで配列が同じ部位は*, 3 菌株ないし 4 菌株で配列が同じ部位は ．で示した。

図 11　*S. oralis* ATCC 9811 株 rGAPDH による *P. gingivalis* 381 株と種々の口腔レンサ球菌との共凝集阻害

10 mM PBS (pH 6.0) 2 ml の反応液中に 5×10^8 個の *P. gingivalis* 381 株菌体と 5×10^8 個の口腔レンサ球菌 5 菌株の各懸濁液を加え, 分光光度計を用いて 37℃で攪拌しながら,吸光度(A_{550})の変化を計測した。 共凝集阻害率は図 3 と同様に式に基づき算出した。

```
S.oralis ATCC 9811              1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
S.oralis ATCC 10557             1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
S.gordonii G9B                  1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
S.sanguinis ATCC 10556          1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
S.parasanguinis ATCC 15909      1 MVVKVGINGFGRIGRLAFRRIQNVEGVEVTRINDLTDPVMLAHLLKYDTTQGRFDGTVEV   60
                                  ************************************************************

S.oralis ATCC 9811             61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEATGFFAKKAAAEKHLHAGGAKKVVI   120
S.oralis ATCC 10557            61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEATGFFAKKDAAEKHLK-GGAKKVVI   119
S.gordonii G9B                 61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPENIDWANDGVEIVLEATGFFATKAAAEKHLHAGGAKKVVI   120
S.sanguinis ATCC 10556         61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEATGFFAKKDAAEKHLK-GGAKKVVI   119
S.parasanguinis ATCC 15909     61 KEGGFEVNGKFVKVSAERDPEQIDWATDGVEIVLEATGFFAKKDAAEKHLK-GGAKKVVI   119
                                  **********************.****.**************.*.******.  ********

S.oralis ATCC 9811            121 TAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   180
S.oralis ATCC 10557           120 TAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   179
S.gordonii G9B                121 TAPGGSDVKTVVFNTNHDILDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   180
S.sanguinis ATCC 10556        120 TAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   179
S.parasanguinis ATCC 15909    120 TAPGGNDVKTVVFNTNHDVLDGTETVISGASCTTNCLAPMAKALQDNFGVVEGLMTTIHA   179
                                  *****.************.******************************************

S.oralis ATCC 9811            181 YTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAANIVPNSTGAAKAIGLVIPELNGKLDGSAQRVPTPT   240
S.oralis ATCC 10557           180 YTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAVNIVPNSTGAAKAIGLVIPELNGKLDGAAQRVPVPA   239
S.gordonii G9B                181 YTGDQMILDGPHRKGDLRRARAGAANIVPNSTGAAKAIGLVIPELNGKLDGAAQRVPTPT   240
S.sanguinis ATCC 10556        180 YTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAVNIVPNSTGAAKAIGRVIPELNGKLDGAAQRVPVPA   239
S.parasanguinis ATCC 15909    180 YTGDQMILDGPHRGGDLRRARAGAVNIVPNSTGAAKAIGRVIPELNGKLDGAAQRVPVPA   239
                                  **************.**********.***************.************.*****.*.

S.oralis ATCC 9811            241 GSVTELVAVLEKNVTVDEVNAAMKAASNESYGYTEDPIVSSDIVGMSYGSLFDATQTKVL   300
S.oralis ATCC 10557           240 GSVTELVAVLEKSVTVDEVNAAMKAASNESYGYTEDPIVSSDILGMSYGSLFDATQTKVL   299
S.gordonii G9B                241 GSVTELVVVLEKNVTVDEVNAAMKAVANESYGYTEDPIVSSDVVGMSYGSLFDATQTKVL   300
S.sanguinis ATCC 10556        240 GSVTELVAVLEKSVTVDEVNAAMKAASNESYGYTEDPIVSSDILGMSYGSLFDATQTKVL   299
S.parasanguinis ATCC 15909    240 GSVTELVAVLEKSVTVDEVNAAMKAASNESYGYTEDPIVSSDILGMSYGSLFDATQTKVL   299
                                  *******.****.************..***************..*****************

S.oralis ATCC 9811            301 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           336
S.oralis ATCC 10557           300 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           335
S.gordonii G9B                301 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           336
S.sanguinis ATCC 10556        300 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           335
S.parasanguinis ATCC 15909    300 DVDGKQLVKVVSWYDNEMSYTAQLVRTLEYFAKIAK                           335
                                  ************************************
```

図 10　*S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH と口腔レンサ球菌 4 菌株 GAPDH とのアミノ酸配列アライメント
配列欠損部位はー, 5 菌株すべてで配列が同じ部位は＊, 3 菌株ないし 4 菌株で配列が同じ部位は ．で示した。